

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia
Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar



Tese

IMPACTO DA IVERMECTINA SOBRE *Eisenia foetida* E ATIVIDADE MICROBIANA NA VERMICOMPOSTAGEM DE ESTERCO BOVINO.

Sandro Moreira Tuerlinckx

Pelotas, 2014

Sandro Moreira Tuerlinckx

IMPACTO DA IVERMECTINA SOBRE *Eisenia foetida* E ATIVIDADE MICROBIANA NA VERMICOMPOSTAGEM DE ESTERCO BOVINO.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Sistemas de Produção Agrícola Familiar.

Orientador: Tânia Beatriz Gamboa Araújo Morselli

Coorientador: Ana Cláudia Kalil Huber

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

T913a Tuerlinckx, Sandro Moreira

Impacto da ivermectina sobre *Eisenia foetida* e atividade microbiana na vermicompostagem de esterco bovino. / Sandro Moreira Tuerlinckx ; Tânia Beatriz Gamboa Araújo Morselli, orientadora ; Ana Cláudia kalil Huber, coorientadora. — Pelotas, 2014.

133 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Medicamentos veterinários. 2. Resíduos animais. 3. Testes toxicológicos. I. Morselli, Tânia Beatriz Gamboa Araújo, orient. II. Huber, Ana Cláudia kalil, coorient. III. Título.

CDD : T631.41

Sandro Moreira Tuerlinckx

IMPACTO DA IVERMECTINA SOBRE *Eisenia foetida* E ATIVIDADE MICROBIANA
NA VERMICOMPOSTAGEM DE ESTERCO BOVINO.

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 25 de abril de 2014.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Tânia Beatriz Gamboa Araújo Morselli (Orientador) - UFPel

Prof. Dr. Danilo Dufech Castilhos - UFPel

Prof. Dr. Eduardo Gonçalves Xavier - UFPel

Prof. Dr. Larri Antônio Morselli – URCAMP/Bagé

Prof. Dr. José Soares do Nascimento - UFPB

Dedico este trabalho à Glaunize e Mariana.

Agradecimentos

À minha orientadora Dra. Tânia, pela amizade, disponibilidade, atenção dispensada, paciência, dedicação, profissionalismo e por me mostrar o quão fascinante é o mundo das minhocas.

À minha co-orientadora Dra. Ana Cláudia, pela ajuda imprescindível no desenvolvimento deste trabalho.

Aos cordenadores e diretores dos Centros de Ciências Rurais e de Ciências da Saúde da Urcamp, pelo apoio e compreensão.

À Proppex/Urcamp e ao PPG-SPAF/UFPel pelo custeio parcial do projeto, permitindo a conclusão desta pesquisa.

Aos meus colegas do PPG-SPAF pela parceria nas aulas e viagens a Pelotas.

À minha esposa Glaunize e minha filha Mariana, pelo amor, companheirismo, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos, tornando agradável a conclusão desta etapa de estudos.

Aos meus pais, Eládio e Marly, que sempre primaram pela minha Educação, não medindo esforços para me oferecer a oportunidade de estudar e alcançar meus objetivos.

Aos meus sogros Ari e Norma, ao meu irmão Márcio e à minha dinda Marlene, que sempre me incentivaram com suas palavras de apoio.

E a Deus, por me conceder a possibilidade da existência.

*“O maior inimigo do conhecimento não é a ignorância, mas a
ilusão do conhecimento”.*

STEPHEN HAWKING

Resumo

TUERLINCKX, Sandro Moreira. **Impacto da ivermectina sobre *Eisenia foetida* e atividade microbiana na vermicompostagem de esterco bovino**. 2014. 143 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

As fontes potenciais de poluentes provenientes de operações agroindustriais incluem resíduos animais, medicamentos veterinários, pesticidas e outros produtos químicos, como detergentes e desinfetantes. As avermectinas são amplamente usadas em medicina veterinária e na agricultura. Estes agentes são excretados, em certa quantidade, nas fezes de animais tratados e tem sido demonstrado que os membros do grupo das avermectinas podem ter efeitos nocivos sobre os organismos não-alvo que utilizam as fezes. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da ivermectina em minhocas *Eisenia foetida*, através da análise de sobrevivência, desenvolvimento, produção de casulos, atividades enzimáticas e comportamento durante a vermicompostagem de esterco bovino em condições de laboratório. Além disso, as alterações químicas e a atividade microbiana do vermicomposto também foram estudadas. As minhocas (n = 10 e com três repetições) foram expostas aos substratos teste contaminados com ivermectina a 0, 1, 5, 10, 50 e 100 mg kg⁻¹. Diferenças significativas foram testadas utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguidas pelo teste de Duncan. Além disso, foram aplicados modelos de regressão para verificar um efeito dose-resposta. Não houve efeitos negativos da ivermectina sobre a mortalidade de minhocas. Da mesma forma, as características químicas e a atividade microbiana do vermicomposto não foram afetados. Os resultados mostram que o teste de fuga não foi suficiente para determinar a toxicidade da ivermectina para *Eisenia foetida* em esterco bovino. No entanto, uma resposta hormética foi registrada em relação ao crescimento e a atividade relativa das enzimas acetilcolinesterase, catalase e fosfatase alcalina em minhocas. Além disso, os resultados mostram valores diminuídos da atividade enzimática da glutationa-s-transferase e aumento dos níveis de hidroperóxidos, em resposta às concentrações mais elevadas de ivermectina ao fim de 7 dias de tratamento. Por outro lado, depois de 28 dias, a atividade da glutationa-s-transferase foi significativamente aumentada (p <0,01) nas exposições a 50mg kg⁻¹ e 100 mg kg⁻¹. Portanto, pode-se concluir que a exposição aguda à elevadas concentrações de ivermectina ocasiona dano celular em minhocas. Adicionalmente, a presença da hormese induzida pela ivermectina em *Eisenia foetida* pode estar relacionada a ativação de vias de adaptação.

Palavras-chave: medicamentos veterinários, resíduos animais, testes toxicológicos.

Abstract

TUERLINCKX, Sandro Moreira. **Impact of ivermectin on *Eisenia foetida* and microbial activity during vermicomposting process of cattle manure.** 2014. 143 f.

Tesis (Doctoral Degree in Agronomy) – Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

The potential sources of pollutants originating from agroindustry operations include animal wastes, veterinary drugs, pesticides and other chemicals such as detergents and disinfectants. The avermectins are extensively used in veterinary medicine and agriculture. Most of these agents are excreted to some extent in the faeces of treated animals and it has been demonstrated that members of the avermectin group may have deleterious effects on non-target organisms utilising the faeces. The objective of this study was to evaluate the influence of ivermectin on *Eisenia foetida* earthworms, by analyzing survival, growth, cocoon production, enzyme activities and behaviour during the vermicomposting of cattle manure under laboratory conditions. Furthermore, the chemical changes and microbial activity of the vermicompost were also studied. The earthworms (n = 10, with three replicates) were exposed to the test substrates contaminated with ivermectin 0, 1, 5, 10, 50 and 100 mg kg⁻¹. Significant differences were tested using analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test. Furthermore, regression models were applied to check a dose-response effect. In this study, there was no negative effects of ivermectin on mortality of earthworms. Likewise the chemical characteristics and microbial activity of vermicompost were not affected. The results show that avoidance test behaviour was not adequate to determine the toxicity of ivermectin for *Eisenia foetida* in cattle manure. However, a hormetic response was recorded on the growth and relative enzyme activity of acetylcholinesterase, catalase and alkaline phosphatase in earthworms. In addition, the results showed decreased values of the glutathione- s-transferase enzyme activity and increased levels of hydroperoxides levels in response to the higher concentrations of ivermectin at 7 days of treatment. On the other hand, after 28 days glutathione- s-transferase activity was significantly increased (p < 0.01) in the exposure to 50mg kg⁻¹ and 100mg kg⁻¹. In conclusion, acute exposure of ivermectin at high concentrations cause cellular injury in earthworms. Additionally, the presence of hormesis induced by ivermectin in *Eisenia foetida* may be related to activation of adaptive pathways.

Key-words: animal wastes, toxicological tests, veterinary pharmaceuticals.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	9
Objetivos.....	10
Objetivo geral.....	10
Objetivos específicos.....	10
Hipótese.....	11
2. Revisão de Literatura.....	12
2.1. A tecnologia da vermicompostagem.....	12
2.2. O esterco bovino como substrato ou resíduo orgânico.....	14
2.3. Ivermectina: características químico-farmacêuticas, resíduos e persistência no esterco e no solo.....	16
2.4. Impactos ambientais gerados pelo uso da ivermectina.....	19
2.5. Testes de toxicidade com <i>Eisenia foetida</i>	23
2.6. Avaliação de efeitos sub-letais pelo uso de marcadores bioquímicos.....	24
3. Projeto de pesquisa.....	28
4. Relatório do trabalho de campo.....	45
5. Artigo 1 - Utilização de biomarcadores bioquímicos em <i>Eisenia foetida</i> (Oligochaeta) para ensaios de ecotoxicidade.....	47
6. Artigo 2 - Effects of ivermectin on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the earthworm <i>Eisenia fetida</i> (Annelida, Oligochaeta).....	69
7. Artigo 3 - Ivermectina induz hormese sobre <i>Eisenia foetida</i> durante o processo de vermicompostagem de esterco bovino.....	95
8. Artigo 4 - Uso do teste de fuga para avaliar a sensibilidade de <i>Eisenia foetida</i> (Annelida, Oligochaeta) à ivermectina em esterco bovino.....	109
9. Conclusões.....	121
10. Referências.....	122

1 Introdução

De acordo com relatório divulgado pela ONU (2013), a população mundial de 7,2 bilhões de pessoas chegará a 9,6 bilhões em 2050, prevendo que o crescimento será principalmente nos países em desenvolvimento.

Este cenário traz uma preocupação adicional, pois atualmente não há comida suficiente no mundo para alimentar todos, 925 milhões de pessoas ainda passam fome. No centro do problema estão a pobreza e a falta de poder, que impedem o acesso a alimentos nutritivos. Esta situação é agravada pela degradação constante dos solos, da água doce, dos oceanos e da biodiversidade. Uma grande reforma do sistema de alimentação e de agricultura é necessária para garantir segurança alimentar para cerca de um bilhão de pessoas que atualmente sofrem com a fome e suportar o crescimento estimado de dois bilhões da população mundial até 2050 (ONU, 2013).

Questões fundamentais a respeito de como os alimentos são cultivados e consumidos precisam ser abordadas. Com o crescimento da classe média global, aumenta também o consumo de carne, cuja produção exige quantidades maiores de grãos e água, colocando pressões crescentes sobre os sistemas agrícolas.

Outro entrave encontrado é a crescente presença de resíduos químicos nos alimentos. Em 2010, o Brasil enfrentou problemas com os Estados Unidos e Japão em razão de lote de produto industrializado com quantidade de resíduos de ivermectina acima da permitida, o que fez com que as exportações de carne e derivados fossem suspensas por sete meses (MAPA, 2010).

Esse fato motivou o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento em decretar a proibição em todo o território nacional, do uso em bovinos de corte criados em regime de confinamento, semi-confinamento e extensivo, na fase de terminação, de produtos antiparasitários que contenham em sua formulação princípios ativos da classe das avermectinas, cujo período de carência ou de retirada descrito na rotulagem seja maior do que vinte e oito dias (MAPA, 2011).

Desta forma, torna-se um desafio aumentar a produção de alimentos sem a presença de substâncias químicas.

A proposta agroecológica representa um estímulo aos agricultores familiares, na medida em que os motiva a buscar alternativas ao atual modelo tecnológico não

só como uma consequência da queda da rentabilidade da agricultura, mas como resultado da percepção do impacto negativo das tecnologias baseadas em insumos químicos, prejudiciais à saúde e ao meio ambiente. No entanto, a maioria dos produtores sul-americanos que comercializam bovinos aplicam de forma intensiva vários medicamentos para o controle de doenças ocasionadas por uma diversidade de parasitos (SUAREZ, 2002).

Enquanto o controle eficaz de parasitos parece uma medida socioeconômica necessária para o agricultor, os efeitos colaterais não intencionais de muitos produtos químicos podem torná-los ambientalmente indesejáveis. Efeitos ecotoxicológicos em organismos não-alvo variam de produto para produto e experiências científicas são necessárias para proporcionar informações adequadas aos produtores, com o objetivo de identificar as substâncias com os menores efeitos prejudiciais aos ecossistemas, ou para gerar alternativas que sejam independentes da utilização de agentes químicos (KRYGER et al., 2005).

Objetivos:

Objetivo geral:

Avaliar o efeito de uma lactona macrocíclica, a ivermectina, sobre os aspectos relacionados com a atividade microbiana e com a sobrevivência e capacidade metabólica da *Eisenia foetida* durante o processo da vermicompostagem de esterco bovino.

Objetivos específicos:

- Analisar o efeito de diferentes concentrações de ivermectina sobre a mortalidade, desenvolvimento e capacidade reprodutiva de *Eisenia foetida* em esterco bovino.
- Verificar a resposta metabólica, por intermédio de ensaios enzimáticos em *Eisenia foetida* exposta a diferentes concentrações de ivermectina em esterco bovino.

- Determinar por intermédio do teste de fuga, o comportamento de *Eisenia foetida* expostas a diferentes concentrações de ivermectina.
- Acompanhar as condições da atividade microbiana, conforme os aspectos relacionados com a evolução de CO₂ e as características químicas durante o processo de vermicompostagem de esterco bovino contaminado experimentalmente com ivermectina.

Hipótese:

A ivermectina em esterco bovino induz efeitos adversos sobre a *Eisenia foetida*, afetando a sua sobrevivência, habilidade reprodutiva, comportamento e capacidade metabólica, podendo interferir inclusive com os aspectos microbiológicos e químicos durante o processo da vermicompostagem.

2 Revisão de Literatura

2.1. A tecnologia da vermicompostagem

Com os impactos adversos de agroquímicos na produção agrícola, atualmente é notório que o rendimento ideal de uma cultura e manutenção da fertilidade do solo só podem ser alcançados através da utilização equilibrada de adubos minerais e adubos orgânicos. A vermicompostagem de resíduos agroindustriais pode ajudar a mitigar esses problemas, uma vez que estes resíduos se forem utilizados de forma eficiente, representam um vasto recurso de nutrientes para as plantas (GARG e GUPTA, 2009).

De acordo com MORSELLI (2009b), o vermicomposto é todo o material decomposto por microrganismos e com auxílio das minhocas e que pode ser utilizado como adubo. Em comparação com a compostagem, a vermicompostagem gera um produto com menor massa, elevado teor de húmus, provavelmente menos fitotóxico, com qualidade fertilizante geralmente superior e em menor tempo de processamento (GARG e GUPTA, 2009). Além disso, prepara o solo biologicamente para que as minhocas nativas ali permaneçam (MORSELLI, 2009b).

Para Landgraf et al. (1999), o efeito do uso do vermicomposto sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo inclui melhorias na estruturação e armazenamento de água, aumento da capacidade de troca de cátions pela geração de cargas elétricas negativas, fonte de liberação lenta de nutrientes para as plantas e aumento da população de microrganismos do solo. Além disso, as substâncias húmicas presentes no vermicomposto possuem atividade reguladora de crescimento de plantas (MUSCOLO et al., 1999; MASCIANDARO et al., 1999; CANELLAS et al., 2002).

A vermicompostagem envolve a biooxidação e estabilização da matéria orgânica através das interações entre minhocas e microrganismos. Embora os microrganismos sejam os principais responsáveis pela a degradação bioquímica da matéria orgânica, as minhocas exercem um papel importante no processo pela fragmentação e condicionamento do substrato, aumentando a área de superfície para o crescimento de microrganismos e alterando suas atividades biológicas (DOMÍNGUEZ, 2004).

Durante a vermicompostagem, a matéria orgânica é estabilizada pela decomposição avançada (humificação) na presença de minhocas (ATIYEH et al., 2001), por intermédio de um processo não termofílico (ELVIRA et al., 1998).

As ações de minhocas durante a vermicompostagem incluem não só a digestão e liberação de substâncias facilmente assimiláveis, mas também o transporte e dispersão de microrganismos através do resíduo (DOMÍNGUEZ, 2004).

As transformações nas propriedades físico-químicas e bioquímicas e o curto tempo em que estas ocorrem tornam o processo da vermicompostagem um adequado sistema para o estudo das interações microrganismos-minhocas (DOMÍNGUEZ, 2004; AIRA et al., 2006a). A presença de minhocas promove mudanças nas comunidades microbianas em vários resíduos orgânicos durante a vermicompostagem (LORES et al., 2006). Além disso, estas comunidades microbianas tornam-se metabolicamente mais eficientes (AIRA et al., 2007). Assim, os relacionamentos entre minhocas e microrganismos são a chave para entender como estes processos ocorrem (AIRA e DOMÍNGUEZ, 2009).

Estudos recentes utilizando a técnica da eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) confirmaram que ocorre intensificação da diversidade de bactérias durante o processo devido à presença de minhocas, especialmente em resposta aos nutrientes em seus coprólitos (ZHAO et al., 2010).

Devido ao fato da *E. foetida* poder digerir a matéria orgânica através de seus microrganismos intestinais, que auxiliam na produção de enzimas, como a amilase, protease, lipase e celulase (AIRA et al., 2006), formulou-se a hipótese de que esses microrganismos poderiam ter efeitos sinérgicos sobre a atividade da *E. foetida* durante a vermicompostagem. Esta hipótese é apoiada por estudos que demonstraram que os microrganismos são ativos nos intestinos de minhocas (HONG et al., 2011).

A presença de *E. foetida* primeiro promove um aumento e depois uma queda na biomassa e atividade microbiana durante a vermicompostagem de dejetos de suínos (AIRA et al., 2007). No entanto, em estudos semelhantes com vermicompostagem de esterco bovino com *E. andrei* (ATIYEH et al., 2000) encontraram que a biomassa microbiana (N_{mic}) manteve-se estável ou mesmo aumentada durante o processo (AIRA et al., 2007b).

Conforme Atiyeh et al. (2000), em presença de minhocas ocorre redução da biomassa microbiana no início do processo, mas aumentam a mineralização do nitrogênio, e melhoram as taxas de conversão do nitrogênio amoniacal em nitrato.

Foi demonstrado também que o estudo das atividades enzimáticas é uma ferramenta confiável para estabelecer a maturidade de vermicomposto, bem como a sua importância na taxa de ciclagem de nutrientes, incluindo carbono, nitrogênio e fósforo (BENÍTEZ et al, 2005).

Em vermicompostos, as máximas atividades enzimáticas são observadas durante 21-35 dias. A maioria das enzimas mostrou correlação com a mudança no número e tipos de grupos microbianos diferentes, como bactérias, fungos e actinomicetos durante a vermicompostagem. As minhocas estimulam a atividade bioquímica e ciclagem de nutrientes, contribuindo para a redução do período de degradação de resíduos agrícolas, resultando em maturação do vermicomposto em menos tempo (HARITHA DEVI et al., 2009).

Benítez et al. (1999) encontraram acentuada redução em atividades da *b*-glicosidase, celulase e protease durante a vermicompostagem de lodo de esgoto. Além disso, esses tipos de resíduos contêm grandes quantidades de metais pesados que são inibidores das atividades enzimáticas.

Raros estudos tem demonstrado o efeito de fármacos veterinários sobre as interações microrganismos/minhocas. No entanto, recentemente Kotzerke et al. (2010) demonstraram, por intermédio da reação em cadeia a polimerase (PCR), que a aplicação de esterco contaminado por sulfadiazina produz um impacto negativo sobre as enzimas nitrato redutases dos microrganismos desnitrificantes que colonizam o trato digestório da oligoqueta *E. foetida*, concluindo que este efeito reduz significativamente a liberação de nitrogênio assimilável ao meio.

2.2. O esterco bovino como substrato ou resíduo orgânico

Estercos e outros resíduos orgânicos oriundos de atividades agropecuárias são fontes importantes para a manutenção da matéria orgânica e sustentar a produtividade do solo. No caso da pecuária intensiva, há uma enorme quantidade de animais gerando excrementos e em muitos casos, tais resíduos não estão sendo

plenamente utilizados, resultando em perda de nutrientes em potencial (GARG et al., 2005). A correta utilização destes resíduos pode melhorar a condição física do solo e a qualidade do ambiente, bem como fornecer nutrientes para as plantas (LOH et al., 2005).

Dentre os fertilizantes não-convencionais tem-se os esterco, que já são utilizados há muito tempo quer em sistemas alternativos como nos convencionais, de modo a melhorar o conteúdo de matéria orgânica do solo. As atividades desenvolvidas na bovinocultura de leite e em confinamento, principalmente, acumulam esterco em grandes quantidades e que poderão ser utilizados na produção de hortaliças (MORSELLI, 2009b).

Os resíduos agroindustriais, que são o produto ou subproduto final do processamento de materiais agrícolas, oferecem propriedades em potencial para serem usados como substratos para as minhocas e microrganismos (GARG e GUPTA, 2009; MORSELLI, 2009b).

Pesquisas revelam que a vermicompostagem é uma tecnologia adequada para a decomposição de diferentes tipos de resíduos orgânicos, tendo a oligoqueta *Eisenia foetida* como a espécie de minhoca mais usada, devido ao fato de ser melhor adaptada a esta condição (MORSELLI, 2009a; MORSELLI, 2009b, GARG e GUPTA, 2009).

Embora diferentes resíduos oriundos da agricultura (VALENTE & MORSELLI 1996; LOH et al., 2005; ANTONIOLLI et al., 2009), de fontes urbanas (PRAMANIK e CHUNG 2010; YADAV e GARG, 2011) e industriais (GARG et al., 2006; RAVINDRAN et al., 2008, SINGH et al., 2010) possam ser utilizados na vermicompostagem com *E. foetida*, no Brasil, o principal material orgânico usado como matéria-prima para a criação de minhocas e produção de húmus é o esterco bovino (ANTONIOLLI et al., 2009; MORSELLI, 2009b).

Há consenso na literatura científica de que o esterco bovino utilizado como substrato apresenta elevado desempenho e diversas vantagens, quando comparado a outras matérias-primas nos processos de vermicompostagem (BANSAL e KAPOOR, 2000; GUNADI et al., 2003; LOH et al., 2005). Entretanto, há um inconveniente com este tipo de substrato, pois vários resíduos de medicamentos veterinários são eliminados nas fezes de animais tratados e desta forma, podem promover efeitos adversos no desenvolvimento e na sobrevivência de organismos associados aos esterco (HOLTER et al., 1993; STRONG et al., 1993). Alguns

destes resíduos farmacêuticos podem persistir por várias semanas em esterco bovino (HERD et al., 1996; ALVINERIE et al., 1999), provocando efeitos sub-letais ou até mesmo letais em minhocas expostas a tais produtos (DIAO et al., 2007; GAO et al., 2007; KOLAR et al., 2008; ROMBKE et al., 2010), podendo comprometer, por exemplo, sua ação na vermicompostagem.

2.3. Ivermectina: características químico-farmacêuticas, resíduos e persistência no esterco e no solo

Parasiticidas veterinários incluem anti-helmínticos, ectoparasiticidas e endectocidas. Anti-helmínticos são usados para controlar parasitos internos, incluindo nematódeos gastrintestinais e pulmonares, enquanto que os ectoparasiticidas são aplicados para controlar parasitos externos dos animais, incluindo ácaros, carrapatos, moscas e piolhos. Já os endectocidas fornecem controle simultâneo de parasitas internos e externos (FLOATE et al., 2005).

A descoberta dos endectocidas macrocíclicos (avermectinas) revolucionou o tratamento e prevenção das doenças parasitárias. Eles são amplamente utilizados devido ao seu amplo espectro de atividade, alta eficiência e elevada margem de segurança. As avermectinas são substâncias semi-sintéticas derivadas do microrganismo de solo *Streptomyces avermitilis*, possuem atividade acaricida e anti-helmíntica e pertencem a um grupo químico chamado de macrolactonas ou lactonas macrocíclicas (SHOOP et al., 1995), sendo administradas aos animais, como bovinos, suínos, ovinos e equinos (OMURA, 2008).

A ivermectina (22,23 dihidroavermectina-B1) é um derivado sintético da avermectina natural B1 (80% B1a e B1b 20%), pertencendo a classe das avermectinas (Figura 1).

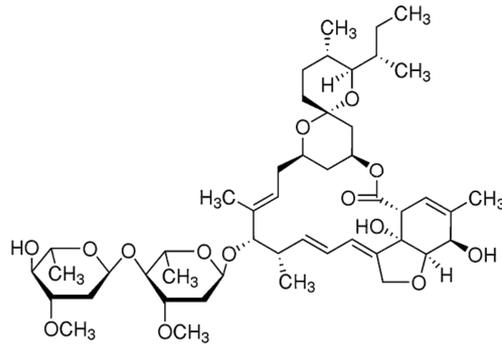


Figura 1: Estrutura química básica da ivermectina.
 FONTE: SHOOP et al. (1995).

A eficácia das avermectinas está relacionada ao seu mecanismo de ação, principalmente devido a sua interação com os canais cloreto dependentes de glutamato em invertebrados. O parasiticida impede o fechamento desses canais, aumentando a permeabilidade aos íons Cl^- . Isto leva a hiperpolarização e transmissão neuronal reduzida, resultando em paralisia e morte dos parasitos. Além disso, inibem os canais de cloro ligados ao ácido γ -aminobutírico (GABA), que ocorrem no sistema nervoso periférico de invertebrados e no sistema nervoso central dos vertebrados (FORRESTER et al. 2003; OMURA e CRUMP, 2004).

Conforme Shoop et al. (1995), a ivermectina, uma das primeiras lactonas macrocíclicas comercializadas, é um parasiticida que tem sido amplamente utilizado no mundo desde a década de 1980.

Em relação à persistência da atividade antiparasitária, as avermectinas ocupam posição de destaque, pois além do seu amplo espectro de ação contra diferentes tipos de parasitos, possuem longo período residual de proteção. Entretanto, este mesmo efeito, que é positivo para o controle parasitário, pode originar consequências danosas ao meio ambiente (HERD, 1995).

As avermectinas são excretadas principalmente através das fezes e grande parcela do medicamento original é eliminado de forma não-metabolizada, ou seja, inalterado, independentemente da formulação comercial utilizada (LUMARET e ERROUISSI, 2002; FLOATE et al., 2005). Desta forma, se a droga é aplicada em animais sob pastejo, seus metabólitos e substâncias ativas serão eliminados juntamente com a urina ou as fezes diretamente no campo, elevando a carga de substâncias químicas despejadas no ambiente local (SOMMER e BIBBY, 2002).

O nível de avermectinas em fezes de animais tratados varia segundo o tipo de animal, doses administradas e formas de aplicação (HALLEY et al., 1989).

Segundo um estudo desenvolvido por Herd et al. (1996), bovinos tratados com “*bolus*” intra-ruminal apresentam concentrações fecais médias de ivermectina de $4,0 \pm 2,0 \mu\text{g g}^{-1}$ (p.p.m.) massa seca aos 14 dias a $3,0 \pm 2,0 \mu\text{g g}^{-1}$ aos 49 dias. Os animais que receberam a formulação *pour-on* tiveram concentrações fecais médias de ivermectina atingindo até $18,5 \pm 7,4 \mu\text{g g}^{-1}$ (p.p.m.) aos 2 dias após o tratamento, caindo então para $0,04 \pm 0,004 \mu\text{g g}^{-1}$ aos 28 dias. Os que receberam o produto na formulação de injeção subcutânea apresentaram concentrações fecais médias de ivermectina de $1,2 \pm 0,34 \mu\text{g g}^{-1}$ (p.p.m.) no 3º dia, declinando para $0,08 \pm 0,0001 \mu\text{g g}^{-1}$ (p.p.m.) aos 28 dias.

Sommer & Steffansen (1993) também relataram maiores concentrações de ivermectina (9,0 ppm) em esterco bovino devido ao uso do produto *pour-on* em comparação com esterco de animais que receberam a formulação injetável (3,9 ppm) entretanto, eles apresentaram persistência ambiental comparável.

No caso dos sistemas de liberação prolongada (*bolus* intra-ruminal), esta formulação foi apontada como sendo potencialmente mais prejudicial para os ecossistemas de pastagens do que quaisquer outras formulações, devido ao seu prolongado período de atividade (HERD et al., 1993). Esta situação foi revelada por Alvinerie et al. (1999), demonstrando que o nível de ivermectina nas fezes de bovinos dosados com um *bolus* intra-ruminal de liberação lenta, atingiu uma concentração máxima de $4,1 \mu\text{g g}^{-1}$, aos quatro dias pós-tratamento, caindo para uma concentração de $1,18 \mu\text{g g}^{-1}$ e manteve-se nestes níveis durante até 120 dias pós-tratamento.

Em um estudo recente com bovinos tratados com dose única por via subcutânea, 35% da ivermectina administrada foi excretada como composto principal nas fezes dentro de 31 dias após o tratamento (FERNANDEZ et al., 2009).

Iglesias et al. (2006) relataram que a concentração de ivermectina permaneceu relativamente constante nas fezes depositadas em pastagem, durante 60 dias, mesmo quando expostas às condições ambientais.

Desde que as avermectinas são usadas principalmente para o tratamento em bovinos, a entrada principal destes produtos para o meio ambiente é através da excreta direta destes animais em pastagens ou através da aplicação de adubo orgânico para a agricultura (HALLEY et al., 1989; HERD et al., 1996; KOSCHORRECK et al., 2002).

A ivermectina adsorve fortemente ao solo e à matéria orgânica (Halley et al., 1989; Krogh et al., 2008), possuindo um baixo potencial de dessorção (Krogh et al., 2008) e, conseqüentemente, um baixo potencial de lixiviação (HALLEY et al., 1989; OPPEL et al., 2004).

Com tempos de meia vida relatada a partir de 7 dias a vários meses, as avermectinas são relativamente persistentes no esterco e no solo. Halley et al. (1989) estudaram a meia-vida de degradação da ivermectina em condições diversas. Na mistura de fezes e solo mantidos à temperatura ambiental e no escuro, os períodos de meia-vida variaram entre 93 e 240 dias, enquanto que em condições externas, foram de 7-14 dias no verão e 91-217 dias de inverno.

O parasiticida mostrou-se muito persistente em fezes bovinas, sem dissipação observada durante 45 dias em um estudo de campo na Dinamarca (Sommer e Steffansen, 1993), e entre 10-60% da concentração inicialmente medida da ivermectina ainda mostrou-se presente após 180 dias em outro estudo conduzido na Argentina (SUAREZ et al., 2003).

Iglesias et al. (2006) relataram que a concentração de ivermectina nas fezes de bovinos tratados, dispostos em pasto durante o outono na Argentina permaneceu relativamente constante durante toda a duração do experimento (60 dias). Em outro estudo, Mougín et al. (2003) encontraram uma dissipação lenta de ivermectina em amostras de solo argiloso mantidos em condições não estéreis no escuro (meia-vida foi de cerca de 240 dias), enquanto a ivermectina não foi degradada em condições estéreis no escuro. Além disso, quando exposta à luz solar, as amostras apresentaram uma dissipação similar mais rápida de ivermectina, que foi estimulado pela mistura do solo depois de 14 dias (meia-vida foi de 21 dias).

A dissipação no solo, em condições aeróbicas, é relativamente lenta (meia-vida de dissipação variou de 16 a 36 dias), e praticamente não houve dissipação significativa observada durante 120 dias em condições anaeróbicas (KROGH et al., 2009).

2.4. Impactos ambientais gerados pelo uso da ivermectina

Medicamentos veterinários são substâncias biologicamente ativas destinadas a inativar organismos como bactérias, vírus e parasitos. Eles também são

potencialmente perigosos para espécies não-alvo, como a fauna que habita tanto o solo como os esterco de origem animal. Os efeitos de anti-helmínticos (antiparasitários) contra insetos que vivem no esterco estão bem documentados (MADSEN et al., 1990; SOMMER et al., 1992; HOLTER et al., 1993).

Substâncias pertencentes ao grupo das avermectinas podem alcançar concentrações potencialmente tóxicas para a reprodução de invertebrados que habitam e alimentam-se do esterco que foi excretado de bovinos tratados com “*bolus*” de liberação prolongada, formulações injetáveis e *pour-on* (HERD et al., 1996).

Quando o esterco é depositado sobre o solo ou estrume é incorporado ao solo, os organismos que vivem neste ambiente podem ser potencialmente expostos a estes produtos (DIAO et al., 2007).

As avermectinas são altamente insolúveis na água e têm uma forte tendência para se ligar a partículas. Desta forma, os resíduos medicamentosos dos endectocidas desta classe ou seus metabólitos em fezes de bovinos ocasionam efeitos adversos em alguns organismos que habitam o esterco e invertebrados não-alvo que vivem no solo (LUMARET e ERROUSSI, 2002; SUAREZ, 2002). Os distúrbios que as lactonas macrocíclicas podem produzir em invertebrados não-alvo e sobre a participação dos seus associados na degradação do esterco e reciclagem de elementos no solo, são imprevisíveis e podem influenciar negativamente a biodiversidade e a sustentabilidade dos ecossistemas agrícolas (KOLAR et al., 2006).

Durante os programas de controle parasitário realizados na América do Sul, Suárez et al. (2003) observaram o efeito da droga sobre a redução de nematóides do solo durante o final da primavera ao início do outono, na região do pampa argentino, enquanto Iglesias (2011) observou que essa substância quando presente nas fezes de bovinos tratados por via subcutânea, sob condições de clima tropical, reduziu o número de Cyclorraphas, Polyphaga e Acari.

A ivermectina foi significativamente mais tóxica para colêmbolos, com valores de $0,26 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo EC_{10} (massa seca) do que para enquitraeídeos, com 14 mg kg^{-1} de solo. A comparação desses resultados com as estimativas de concentrações ambientais esperadas indica um risco potencial de ivermectina para as espécies não-alvo, tais como colêmbolos e enquitraeídeos (JENSEN et al., 2003).

O crescimento da população de *Pristionchus maupasi*, um nematóide do solo, foi significativamente reduzida na concentração de $5\mu\text{g g}^{-1}$ de ivermectina nas fezes (GRONVOLD et al., 2004).

Um dos efeitos negativos mais inquietantes da droga no contexto das atividades agrícolas é o período de degradação fecal. Com o atraso deste processo há redução das áreas de pastagem, pois o gado evita comer em torno das fezes depositadas, o que por sua vez, leva a perdas econômicas. Embora os dados disponíveis sugiram que o uso de avermectinas possa retardar a degradação do esterco, os resultados são variáveis e ainda inconclusivos (FLOATE et al., 2005).

A influência da ivermectina sobre a consequente decomposição do esterco tem sido debatida. Alguns autores, que demonstraram a diminuição da população de invertebrados e insetos que habitam o esterco proveniente de animais tratados com ivermectina, sugerem que há também redução da taxa de decomposição do esterco (WALL e STRONG, 1987; FLOATE, 1998; MUGALE et al., 2013).

Da mesma forma, Gunn e Sadd (1994) sugerem que o impacto da ivermectina sobre o crescimento e a fecundidade das minhocas, que estão estreitamente associadas ao esterco e importantes para a sua degradação, pode explicar o retardo na decomposição do estrume em pastagens de bovinos tratados com ivermectina. Recentemente, Rombke et al. (2010) demonstraram que os esterco de bovinos tratados com ivermectina degradam mais lentamente do que os de bovinos não tratados.

A variação na taxa de degradação do esterco fornece evidências indiretas de que a ivermectina em resíduos fecais afetam microrganismos. Sommer e Bibby (2000) examinaram o efeito de vários medicamentos veterinários sobre os processos de decomposição do esterco na ausência da macrofauna. Estes autores detectaram degradação reduzida com o uso de ivermectina, levamisole, fenbendazole, α -cipermetrina e espiamicina, entretanto não foram capazes de determinar se os atrasos na decomposição eram devidos aos efeitos sobre os detritívoros ou agentes microbianos.

Floate (1998) constatou um retardo na degradação devido à ausência de atividade de colonização de organismos nas fezes de bovinos tratados com ivermectina. Enquanto que Sommer e Bibby (2002) relataram que esta molécula influencia negativamente a decomposição do esterco e da matéria orgânica no solo. Os estudos utilizando a percentagem de matéria orgânica como indicador da

degradação de esterco e a reciclagem dos nutrientes subsequentes mostraram uma degradação atrasada em amostras de animais tratados com ivermectina (IGLESIAS et al., 2011).

É possível concluir que, nas fezes de bovinos tratados por via subcutânea durante o outono e expostas ao ambiente por 60 dias, os níveis de ivermectina permanecem elevados em relação aos dados de ecotoxicidade documentados. Por sua vez, isso afeta a colonização fecal natural, reduzindo a abundância e a diversidade da fauna do esterco, mas também retarda a degradação da matéria orgânica (IGLESIAS et al., 2006).

Apesar de haver um atraso na decomposição do esterco de animais tratados, foi observado em condições de laboratório, que o número de minhocas encontradas em fezes de bovinos não tratados foi semelhante a dos animais que receberam o endectocida (HALLEY et al., 1993).

Não há consenso na literatura científica em relação aos efeitos adversos das avermectinas sobre a atividade de minhocas (WALL e STRONG, 1987; MADSEN et al., 1990; SOMMER et al., 1992; WRATTEN et al., 1993; SVENDSEN et al., 2003). De fato, Barth et al. (1994) não encontraram efeitos sobre a variedade de espécies ou número de minhocas associadas ao esterco de bovinos tratados com ivermectina, por via subcutânea de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ corporal. Svendsen et al. (2003) investigaram os efeitos a longo prazo de ivermectina sobre as populações de minhocas durante duas estações de pastejo na Dinamarca. A ivermectina excretada pelas novilhas que tinham sido administradas com *bolus* de liberação lenta não causou impacto negativo sobre o tamanho da população de minhocas, biomassa e composição de espécies.

Um estudo conduzido por Kaneda et al. (2006), avaliando os efeitos da ivermectina residual encontrada nas fezes sobre a atividade de minhocas e decomposição do esterco em solo japonês, demonstraram que *Heteropoda* e *Feretima (Amynthes) divergens* não foram afetadas. O estudo sugere que a ivermectina pode não ter efeitos adversos sobre a atividade dos Megascolecidae e sobre a degradação de esterco nas pastagens em locais onde as minhocas dominam a comunidade de decompositores.

Halley et al. (1989) ao verificarem que *Eisenia foetida* expostas à ivermectina em solo artificial preconizado pela OECD encontraram uma CL_{50} de 314 mg kg^{-1} . Entretanto, Gunn e Sadd (1994) verificaram que as minhocas (*Eisenia foetida*)

expostas a ivermectina em solo artificial não sobreviveram em concentrações acima de 20 mg kg^{-1} (massa seca), além disso, relataram que a produção de casulos foi significativamente reduzida em solo contendo 4 mg kg^{-1} . Enquanto que, Rombke et al. (2009) demonstraram que sobrevivência de minhocas é afetada pela concentração nominal de 10 mg kg^{-1} de ivermectina no solo (massa seca) e que a reprodução é prejudicada na ordem de $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo (massa seca).

2.5. Testes de toxicidade com *Eisenia foetida*

Minhocas agem como engenheiros de ecossistemas atuando em processos que ocorrem no solo, influenciando as propriedades físicas, químicas e biológicas, (GORRES et al., 2001). Elas são, portanto, importantes organismos modelo usados em testes de toxicidade terrestre (BUCKERFIELD et al., 1997).

Entre as várias espécies de minhocas, a *Eisenia foetida* é especialmente apropriada para os testes de toxicidade, pois podem ser facilmente criadas em uma variedade de resíduos orgânicos e com tempos de geração curto. Além disso, sua susceptibilidade aos produtos químicos se assemelha a minhocas de solo (YASMIN e D'SOUZA, 2007).

De fato, *Eisenia foetida* foi estabelecida como a espécie mais comum usada para testes de padronização em ensaios de ecotoxicidade aguda e crônica para os produtos químicos (OECD, 1984). Esta espécie também é útil como um organismo sentinela para pesquisar a qualidade do ambiente terrestre e vários protocolos têm sido desenvolvidos para avaliar os efeitos dos produtos químicos sobre as minhocas (OECD, 1984; ISO, 1993; OECD, 2004).

As minhocas têm desempenhado um importante papel em testes de toxicidade, principalmente com uma maior ênfase pela avaliação da dose ou concentração letal média (DL_{50} ou CL_{50}). Este parâmetro tem sido usado em testes padronizados de toxicidade aguda, como o de contato com papel de filtro e teste do solo artificial (OECD, 1984), que ainda possuem importância, especialmente para a triagem inicial de novos produtos químicos.

No entanto, atualmente é amplamente reconhecido que os testes de toxicidade concebidos para medir parâmetros sub-letais, como a fecundidade (teste

de reprodução), taxa de crescimento, a viabilidade do casulo e características comportamentais fornecem dados mais sensíveis e ecologicamente relevantes, que permitem a avaliação de um contaminante nas populações e nas comunidades de um ecossistema (HELLING et al., 2000; LUKKARI et al., 2005).

O esterco bovino é um reconhecido alimento para minhocas e é regularmente utilizado em estudos ecotoxicológicos (LOWE e BUTT, 2007). Neste sentido, o esterco bovino foi empregado como substrato teste para verificar o efeito de fármacos de uso veterinário sobre a *E. foetida* (GAO et al., 2007a; GAO et al., 2007b).

O comportamento de evasão de minhocas é considerado um parâmetro ecologicamente relevante para ser usado como um indicador da qualidade do solo em ensaios sub-letais (HUND-RINKE e WIECHERING, 2001).

Pesquisas demonstram que as minhocas evitam solos contaminados com pesticidas, principalmente com fungicidas (NATAL-DA-LUZ et al., 2004; ZHOU et al., 2007; GARCIA et al., 2008), inseticidas (REINECKE e REINECKE, 2007) e herbicidas (MARQUES et al., 2009). Entretanto, não há muita informação publicada sobre impactos negativos provocados por aplicações de fármacos de uso veterinário sobre parâmetros comportamentais.

A evasão de minhocas, e a conseqüente perda de suas funções benéficas no solo (aeração, drenagem, enriquecimento do material orgânico, etc) pode levar a uma degradação da qualidade do ambiente. Além disso, a perda de minhocas a partir de uma área pode também afetar o número e a distribuição dos seus predadores vertebrados. Assim, a migração das minhocas pode afetar um ecossistema. Conseqüentemente, os testes com parâmetros comportamentais devem ser incluídos nas baterias de testes ecotoxicológicos a fim de avaliar os impactos de produtos químicos aos ecossistemas (SCHAEFER, 2003).

2.6. Avaliação de efeitos sub-letais pelo uso de marcadores bioquímicos

Lowe e Butt (2007) sugeriram que uma maior utilização de técnicas já estabelecidas aliada às exigências ecológicas e de comportamento das espécies aumentará a consistência e a validade dos testes de toxicidade sub-letais em minhocas.

Como a mortalidade não é obviamente o único parâmetro a ser considerado em um estudo ecotoxicológico, há então, um interesse crescente no desenvolvimento de biomarcadores subletais nas mais diversas espécies (CAPOWIEZ et al., 2003). A exposição a produtos químicos prejudiciais provoca alterações moleculares, bioquímicas, fisiológicas ou morfológicas nos organismos vivos e podem, desta forma, ser usados como biomarcadores (DEPLEDGE e FOSSI, 1994). Neste sentido, a utilização de biomarcadores bioquímicos para investigar o contaminante e seu potencial de neurotoxicidade ou metabolização em minhocas tornou-se hoje prática corrente (LUKKARI et al., 2004; DENOYELLE et al. 2007; REINECKE E REINECKE, 2007).

As atividades enzimáticas são consideradas como índices de fácil prognóstico da reação individual ao estresse ambiental, e permite a previsão das consequências da poluição nas populações e ecossistemas (LUKKARI et al., 2004). Recentemente, Gao et al. (2007) demonstraram que a investigação de atividades enzimáticas em tecidos de *Eisenia foetida* pode fornecer informações importantes em termos de efeitos tóxicos da contaminação do solo e do ambiente e ser utilizados como sistemas precoces de alerta para a exposição de antiparasitários como poluentes.

Enzimas como a acetilcolinesterase podem servir de parâmetro confiável para avaliar a toxicidade de metais pesados e pesticidas (DEMBELE et al., 1999; RAO et al., 2003; GAMBI et al., 2007).

Atualmente, já está bem caracterizada a atividade da enzima acetilcolinesterase para diversas espécies de minhocas (CASELLI et al., 2006; RAULT et al., 2007). Desta forma, as respostas bioquímicas em *Eisenia foetida* pelo uso da acetilcolinesterase são avaliadas sob as mais diversas condições, por exemplo, nas exposições a solos artificialmente contaminados por chumbo e cádmio (Scaps et al., 1997), ou por carbaril (Ribera et al., 2001), para avaliação do potencial neurotóxico de azodrin (Rao e Kavitha, 2004), ao contato com pesticidas organofosforados profenofós (Reddy e Rao, 2008) e temefós (Hackenberger et al., 2008) e ainda para verificar o potencial impacto de líquidos iônicos imidazólicos (LUO et al., 2009).

Enzimas da classe das glutationa-S-transferase possuem uma grande flexibilidade e representam o ponto fundamental das vias metabólicas na degradação e excreção de conjugados de xenobióticos (SHEEHAN, 2001). Bogeraas et al. (1996) identificaram e caracterizaram a enzima glutationa-S-

transferase em minhocas do gênero *Eisenia* e Saint-Denis et al. (1998) demonstraram que minhocas da espécie *Eisenia foetida* são metabolicamente bem equipadas para responderem à presença de substâncias químicas pró-oxidantes, principalmente devido a existência de atividade substancial da enzima glutationa-S-transferase (GST) e de outras enzimas correlacionadas. Sabe-se que a enzima GST é conhecida por reagir em minhocas após exposição a toxinas do solo, sugerindo esta enzima como candidata a biomarcador molecular da poluição (ALY e SCHRODER, 2008; LACOURSE et al., 2009).

As enzimas alfa-amilase e fosfatase alcalina também têm sido descritas em minhocas da espécie *E. foetida* (PARK et al., 1996, 1998; PRABHA et al., 2007; UEDA et al., 2008) e estão associadas ao trato digestório participando de processos degradativos envolvendo, respectivamente, o carbono e fósforo orgânicos.

As aminotransferases possuem um importante papel no metabolismo do nitrogênio em diversas espécies, pois catalisam a primeira etapa no catabolismo de aminoácidos e são utilizadas com sucesso como marcadoras de lesões teciduais em mamíferos (CAMPBELL e FARRELL, 2009).

Embora se saiba que as minhocas excretam o nitrogênio oriundo de seu metabolismo na forma de uréia, amônia e nitrato (WHALEN et al., 2000), até o presente momento são raros os trabalhos correlacionando as aminotransferases com as oligoquetas (SCAPS et al., 1997).

As defesas antioxidantes contra espécies reativas de oxigênio fazem parte do processo evolutivo em todos os organismos aeróbios e incluem uma série de enzimas, entre as quais pode ser destacado a catalase. Sistemas de enzimas antioxidantes são adaptáveis e alterações na sua atividade são bem conhecidos por serem desencadeadas por estresse oxidativo (HERMES-LIMA et al., 2001).

A atividade da enzima catalase em minhocas da espécie *Eisenia foetida* já foi determinada e caracterizada por Saint-Denis et al. (1998) e utilizada para estudar respostas bioquímicas destas minhocas expostas ao carbaril (RIBERA et al., 2001). Song et al. (2009) demonstraram que a atividade global da catalase em *Eisenia foetida* foi estimulada por baixas concentrações de atrazina e inibida quando exposta a altas concentrações deste herbicida.

Em várias condições prejudiciais aos organismos, as atividades das enzimas antioxidantes são aumentadas em resposta ao estresse oxidativo, mas em muitos casos, a resposta adaptativa não consegue compensar a elevada produção de

substâncias pró-oxidantes, desencadeando então o efeito conhecido como lipoperoxidação (HERMES-LIMA et al., 2001). Este evento também está relacionado aos efeitos tóxicos de diversas substâncias químicas, injúrias nos tecidos e no desenvolvimento de doenças (DAL-PIZZOL et al., 2000). Desta forma, os ensaios de lipoperoxidação servem como biomarcadores do estresse oxidativo em organismos expostos à substâncias químicas diversas, produtos tóxicos e a diferentes estressores ambientais (ZWART et al., 1999).

Testes de lipoperoxidação também são empregados em avaliações com *Eisenia foetida*. Xue et al. (2009) avaliaram a geração do radical hidroxil e o estresse oxidativo em *Eisenia foetida* expostas ao tetrabromobisfenol A, empregando o método do TBARS, assim como Gaete et al. (2010), que utilizaram este mesmo teste para avaliar a toxicidade do cobre em solos através de biomarcadores do estresse oxidativo em *Eisenia foetida*.

Hermes-lima et al. (1995) propuseram um método alternativo baseado na oxidação do Fe (II) por peróxidos lipídicos em condições ácidas, sendo, então, complexado com o alaranjado de xilenol. Esses autores adaptaram este método, primeiramente descrito por Jiang et al. (1991, 1992), para extratos de tecidos heterogêneos de animais endotérmicos. Este procedimento foi nomeado por Jiang et al. (1991) como ensaio FOX (oxidação de ferro e/ou método do alaranjado de xilenol) e mostrou ser um método rápido e preciso para medir os peróxidos lipídicos. Além disso, é um método versátil e recentemente foi adaptado por Montserrat et al. (2003), para a detecção da lipoperoxidação em tecidos de invertebrados.

O método FOX é amplamente utilizado com a finalidade de avaliar a lipoperoxidação nos mais diversos sistemas biológicos (GAY et al., 1999; GAY e GEBICKI, 2003; BOU et al., 2008).

3 Projeto de Pesquisa

PRPPG – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Modelo Estruturado

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA IVERMECTINA SOBRE A *Eisenia foetida* E A ATIVIDADE MICROBIANA DURANTE O PROCESSO DE VERMICOMPOSTAGEM DE ESTERCO BOVINO.

Equipe:

- Dr^a. Tânia Beatriz Gamboa Araújo Morselli.
- Dr^a. Ana Cláudia Kalil Huber.

Sandro Moreira Tuerlinckx

Pelotas, 2010.

1. Caracterização do Problema

Nos últimos anos, há uma tendência acentuada para a utilização de novas tecnologias, baseadas principalmente em processos biológicos, na reciclagem e utilização eficiente dos resíduos orgânicos. Com isso, é possível conservar os recursos disponíveis e recuperar os produtos naturais e, em alguns casos, combater os problemas de disposição e minimizar os efeitos da poluição (GARG & GUPTA, 2009). Neste sentido, a vermicompostagem surgiu como uma biotecnologia inovadora e de baixo custo para a conversão de resíduos agro-industriais em um produto de valor agregado, que pode ser utilizado para melhorar a estrutura e a fertilidade do solo (MORSELLI, 2009b).

A vermicompostagem é geralmente definida como a decomposição da fase sólida de resíduos orgânicos em ambiente aeróbio, envolvendo a biooxidação e estabilização da matéria orgânica através da ação conjunta de minhocas e microorganismos (DOMÍNGUEZ, 2004; GARG & GUPTA, 2009). No processo de vermicompostagem, a ação das minhocas é tanto física/mecânica e bioquímica. A participação física na degradação de substâncias orgânicas resulta na fragmentação, aumentando assim a área de superfície para maior colonização microbiana. As minhocas parecem ter desenvolvido relações mutualísticas com os microorganismos ingeridos que auxiliam na decomposição de matéria orgânica presente em seus alimentos (LATTUAD et al 1999; GARG & GUPTA, 2009), tornando o processo da vermicompostagem um adequado sistema para o estudo das interações minhocas-microorganismos (AIRA et al., 2006).

As propriedades microbiológicas, como o conteúdo da biomassa microbiana e as atividades enzimáticas associadas, regulam a dinâmica de nutrientes durante a maturação do vermicomposto (SCHIMEL E BENNET, 2004). Assim, o estudo da atividade das enzimas tem se mostrado uma ferramenta confiável para estabelecer a maturidade do vermicomposto (BENÍTEZ et al., 2002; BENÍTEZ et al., 2005), bem como a sua importância na taxa de ciclagem de nutrientes, incluindo carbono, nitrogênio e fósforo (CARREIRO et al., 2000; AIRA et al., 2007; GARG & GUPTA, 2009).

Desta forma, a enzima celulase, que atua no ciclo do carbono em uma grande variedade de ecossistemas (SINSABAUGH, 1994; SINSABAUGH e MOORHEAD, 1994), a atividade da fosfatase alcalina, envolvida no ciclo do fósforo, responsável pela hidrólise de ésteres de fosfato orgânico em fósforo inorgânico (ALEF et al., 1995) e a atividade das proteases que catalisam a despolimerização de compostos orgânicos contendo nitrogênio em N dissolvido, que é um passo crítico no ciclo do nitrogênio (SCHIMEL e BENNET, 2004), têm sido amplamente estudadas com o propósito de avaliar o processo da vermicompostagem (AIRA et al., 2007).

A técnica da vermicompostagem é largamente utilizada para processar diversos tipos de resíduos (EDWARDS e ARANCON, 2004), tendo a oligoqueta *Eisenia foetida* como a espécie de minhoca mais usada por ser melhor adaptada a esta condição (EDWARDS 2004; MORSELLI, 2009a; MORSELLI, 2009b, GARG e GUPTA 2009).

Embora diferentes resíduos oriundos da agricultura (VALENTE & MORSELLI; 1996; GUNADI et al., 2003; LOH et al., 2005; AQUINO et al., 2005; ANTONIOLLI et al., 2009; MORSELLI, 2009b), resíduos de fontes urbanas (Da SILVA et al., 2002; PRAMANIK e CHUNG 2010; YADAV e GARG, 2011) e industriais (ELVIRA et al., 1998; KAUSHIK e GARG, 2003; GARG et al., 2006; REVINDRAN et al., 2008, SINGH et al., 2010) possam ser utilizados na vermicompostagem com *E. foetida*, no Brasil, o principal material orgânico usado como matéria prima para a criação de minhocas e produção de húmus é o esterco bovino (ANTONIOLLI et al., 2009; MORSELLI, 2009b).

Há consenso na literatura científica que o esterco bovino utilizado como substrato apresenta elevado desempenho e diversas vantagens, quando comparado a outras matérias-primas nos processos de vermicompostagem (REINECKE e VENTER, 1997; BANSAL e KAPOOR, 2000; GUNADI et al., 2003; LOH et al., 2005).

Entretanto, há um inconveniente com este tipo de substrato, pois vários resíduos de medicamentos veterinários são eliminados nas fezes de animais tratados e desta forma, podem promover efeitos adversos no desenvolvimento e na sobrevivência de organismos associados aos estercos (WARDHAUGH e MAHON, 1991; HOLTER et al., 1993; STRONG et al., 1996), resultando em uma reduzida taxa de degradação, como evidenciado em experimentos onde a matéria orgânica foi quantificada em estrume depositado sobre a superfície do solo (MADSEN et al., 1990; SOMMER et al, 1992; SOMMER e BIBBY, 2002).

Alguns destes resíduos farmacêuticos podem persistir por várias semanas em esterco bovino (HERD et al., 1996; ALVINERIE et al., 1999), provocando efeitos sub-letais ou até mesmo letais em minhocas expostas a tais produtos (DIAO et AL., 2007; GAO et al., 2007ab; KOLAR et al., 2008; ROMBKE et al., 2009), podendo comprometer, por exemplo, sua utilização para vermicompostagem.

A ivermectina é um antiparasitário pertencente à classe das avermectinas, incluída no grupo químico dos endectocidas macrocíclicos. Seu uso é largamente difundido devido ao amplo espectro de atividade tanto contra ectoparasitas como endoparasitas, alta eficiência e elevada margem de segurança para mamíferos. É uma substância semi-sintética derivada do microorganismo de solo *Streptomyces avermitilis* (SHOOP et al., 1995).

As avermectinas são excretadas principalmente através nas fezes, sendo até 98% do medicamento original eliminado de forma não-metabolizada, ou seja, inalterado (MCKELLAR e BENCHAOUI DE 1996; MCKELLAR, 1997; LUMARET e ERROUISSI 2002). De fato, a ivermectina é apenas parcialmente metabolizada pelos bovinos, suínos e ovinos. Como resultado, uma quantidade considerável do fármaco é excretada, principalmente via fezes (HALLEY et al., 1989).

Estudos mostram que as concentrações médias de ivermectina eliminadas nas fezes variam segundo o tipo de animal, doses administradas e formas de aplicação (HALLEY et al., 1989; SOMMER & STEFFANSEN 1993; HERD et al., 1993; HERD et al. 1996; ALVINERIE et al., 1999).

Apesar da considerável variabilidade entre os resultados de diferentes estudos de biodegradação/transformação, a ivermectina tem sido considerada como potencialmente persistente no meio ambiente. De fato, este endectocida mostrou-se muito persistente em fezes bovinas, apresentando baixa dissipação e elevada persistência (HALLEY et al., 1989; SOMMER e STEFFANSEN 1993; MOUGIN et al., 2003; SUAREZ et al., 2003; IGLESIAS et al., 2006; KROGH et al., 2009).

Uma série de estudos tem concluído que resíduos das avermectinas produzem efeitos deletérios em diversas espécies de Diptera, Coleoptera, Acarie e Nematoda que habitam os esterco (WALL e STRONG, 1987; MADSEN et al., 1990; WARDHAUGH e MAHON, 1991; SOMMER et al., 1992; BARTH et al., 1993; WRATTEN et al., 1993; IGLESIAS 1998; SUÁREZ et al. 2003; JENSEN et al., 2003; SVENDSEN et al., 2003; GRONVOLD et al., 2004; DIAO et al. 2007).

A influência da ivermectina sobre a conseqüente decomposição do esterco também tem sido debatida (WALL e STRONG 1987; GUNN e SADD 1994; FLOATE 1998).

Floate (1998) relatou uma deficiente degradação devido à ausência de atividade de colonização de organismos nas fezes de bovinos tratados com ivermectina, enquanto que, Sommer e Bibby (2002) registraram que esta molécula influencia negativamente a decomposição do esterco e da matéria orgânica no solo.

Embora não haja consenso na literatura científica em relação aos efeitos adversos das avermectinas sobre a atividade de minhocas (WALL e STRONG, 1987; MADSEN et al., 1990; SOMMER et al., 1992; WRATTEN et al., 1993; SVENDSEN et al. , 2003; KANEDA et al., 2006), uma série de estudos tem demonstrado o impacto negativo de medicamentos desta classe sobre a sobrevivência e reprodução de diversas espécies de oligoquetas (WISLOCKI et al. 1989; SUN et al. 2005; DIAO et al., 2007).

Como a mortalidade não é obviamente o único parâmetro a ser considerado em um estudo ecotoxicológico, há então, um interesse crescente no desenvolvimento de biomarcadores subletais nas mais diversas espécies (CAPOWIEZ et al., 2003; PIOLA et al., 2009).

Frequentemente, a exposição a produtos químicos induz a alterações moleculares, bioquímicas, fisiológicas ou morfológicas nos organismos vivos e podem, desta forma, ser usados como biomarcadores (DEPLEDGE e FOSSI, 1994).

A toxicidade e a nocividade de agentes químicos para as minhocas podem ser avaliados utilizando uma variedade de parâmetros biológicos. O emprego de biomarcadores bioquímicos para investigar o contaminante e seu potencial de neurotoxicidade, metabolização e destoxificação em minhocas tornou-se hoje prática corrente (LUKKARI et al., 2004; DENOYELLE et al. 2007; REINECKE E REINECKE, 2007).

As atividades enzimáticas são consideradas como índices de fácil prognóstico da reação individual ao estresse ambiental, e permitem a previsão das conseqüências e impactos que uma determinada substância pode provocar nas populações e ecossistemas (LUKKARI et al. 2004).

Dentro deste contexto, as enzimas acetilcolinesterase (SCAPS et al., 1997; RIBERA et al., 2001; RAO e KAVITHA, 2004; REDDY e RAO, 2008; HACKENBERGER et al., 2008; LUO et al., 2009), glutathione-S-transferase (BOGERAAS et al. 1996; SAINT-DENIS et al. 1998; ALY e SCHRODER, 2008; LACOURSE et al., 2009), amilase e fosfatase alcalina (PARK et al., 1996, 1998; PRABHA et al., 2007; ZAMBARE et al., 2008) têm sido amplamente empregadas para avaliar o efeito de diversas substâncias químicas sobre os aspectos bioquímicos em minhocas da espécie *E. foetida*.

Recentemente, a determinação do estresse oxidativo e da lipoperoxidação, que também podem ser provocados pela exposição a poluentes ambientais são alvos de intensas pesquisas envolvendo a *E. foetida* (LIU et al., 2009; SONG et al., 2009; XUE et al., 2009; GAETE et al., 2010; CHEN et al., 2011).

Objetivos e Metas

Objetivo Geral:

Avaliar o efeito de uma lactona macrocíclica, a ivermectina, sobre os aspectos relacionados com a atividade microbiana e com a sobrevivência e capacidade metabólica da *Eisenia foetida* durante o processo da vermicompostagem de esterco bovino.

Objetivos Específicos:

- Analisar o efeito de diferentes concentrações de ivermectina sobre a mortalidade, desenvolvimento e capacidade reprodutiva de *Eisenia foetida* em esterco bovino.
- Verificar a resposta metabólica, por intermédio de ensaios enzimáticos e de estresse oxidativo em *Eisenia foetida* exposta a diferentes concentrações de ivermectina em esterco bovino.
- Acompanhar as condições da atividade microbiana, conforme os aspectos relacionados com a biomassa, evolução de CO₂ e atividades enzimáticas durante o processo de vermicompostagem de esterco bovino contaminado experimentalmente com ivermectina.

Metas:

- Comprovar que a ivermectina pode induzir mortalidade e retarda o desenvolvimento e a capacidade reprodutiva de *Eisenia foetida* em esterco bovino.
- Demonstrar que os ensaios enzimáticos e de estresse oxidativo, são úteis para avaliar a adaptação ou o impacto que diferentes concentrações de ivermectina possam ocasionar sobre a *Eisenia foetida* em esterco bovino.
- Evidenciar que a ivermectina é capaz de interferir no processo de vermicompostagem, através do acompanhamento da atividade microbiana, biomassa microbiana e atividades enzimáticas presentes no vermicomposto.

2. Metodologia

Substância química teste

Para todos os testes, a substância padrão de ivermectina (alto grau de pureza, > 98%) será adquirida da Sigma-Aldrich (Divisão-Brasil).

Organismos Teste:

Minhocas do gênero *Eisenia* da espécie *foetida* (Lumbricidae, Annelida) serão obtidas a partir do Minhocário da UFPel – Pelotas/RS e posteriormente multiplicadas e mantidas no minhocário da URCAMP/Bagé-RS de acordo com as condições descritas por (MORSELLI 2009a). Para aclimatar os animais antes dos ensaios, eles serão mantidos em substrato semelhante ao substrato teste (esterco bovino). As minhocas utilizadas nos experimentos serão adultas com clitelo desenvolvido, com pelo menos três meses de idade, mas não mais que um ano, com pesos individuais variando entre 350 e 500 mg.

Elas serão retiradas do substrato de manutenção 24 h antes do início dos testes, selecionadas e armazenadas em placas de Petri sobre papel filtro úmido no Laboratório de Bioquímica Toxicológica – IPAE/CCR/URCAMP-Bagé, RS, sob temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ com luz 12:12 h: ciclo claro-escuro, para esvaziamento do conteúdo intestinal.

Procedimento Experimental.

Será usado esterco bovino como substrato teste neste estudo, oriundo dos mesmos animais e do mesmo local do esterco usado para a manutenção, livre de resíduos de produtos veterinários. Os substratos serão previamente analisados para verificação do pH e da relação C/N. A substância química teste (ivermectina) dissolvida em acetona e em seguida, misturadas com o esterco para alcançar as concentrações nominais dos tratamentos a serem efetuados 0; 1,0; 5,0 e 10,0mg kg⁻¹ peso seco. Água destilada será adicionada à mistura, para atingir 75% do peso. Os substratos depois de serem tratados com a substância química serão transferidos para recipientes plásticos, que serão colocados em gabinete ventilado para permitir a evaporação da acetona residual durante 16 horas. Água será adicionada para compensar o peso perdido, devido à evaporação de acetona e, em seguida as minhocas serão introduzidas.

Este teste segue as recomendações preconizadas por Gao et al. (2007a). Ambos os tratamentos terão quatro recipientes, cada um contendo 12 minhocas da espécie *Eisenia foetida* adultas com clitelo, obtidas como descritas no item anterior. Para evitar que as minhocas escapem e que ocorra presença de organismos indesejados, os recipientes serão cobertos com um tecido de algodão firmemente fixados com atilhos de borracha (MORSELLI, 2009a), este método também permite uma adequada ventilação.

Os recipientes serão mantidos sob temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ com luz 12:12 h: ciclo claro-escuro Laboratório de Bioquímica Toxicológica – IPAE/CCR/URCAMP-Bagé, RS. No teste de toxicidade, os efeitos sobre o desenvolvimento, mortalidade e marcadores bioquímicos serão determinados durante um período de quatro semanas de exposição. Desta forma, para estes testes de toxicidade, a mortalidade, a biomassa e as análises bioquímicas (ensaios enzimáticos e lipoperoxidação) em *Eisenia foetida* serão registradas após 7, 14, 21 e 28 dias, de acordo com as recomendações de OECD *guideline 207* (1984).

Para avaliar a capacidade reprodutiva (fecundidade), serão analisados a produção de casulos e a eclodibilidade durante um período de 56 dias.

Para a análise da biomassa microbiana, atividade microbiana e atividade enzimática associada aos microorganismos, amostras do substrato teste serão coletadas dos grupos experimentais nos dias 0, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 do processo de vermicompostagem.

Mortalidade e inibição do crescimento de *Eisenia foetida*.

A mortalidade da *E. foetida* será determinada pela contagem do número de minhocas não sobreviventes em cada etapa do experimento. As minhocas serão consideradas mortas se elas não tiverem movimento e não responderem a nenhum estímulo tátil definido até a porção final anterior. Como as minhocas tendem a desintegrar-se rapidamente após a morte, elas serão consideradas como mortas se estiverem faltando no momento de cada avaliação (OECD 2004). As contagens nas diferentes concentrações serão comparadas com o grupo controle.

Cada concentração do produto testado será representada por quatro repetições, e um grupo adicional de quatro repetições para o tratamento controle. Minhocas serão pesadas semanalmente durante o experimento para determinar o efeito da ivermectina sobre o crescimento. Antes da pesagem, todas as minhocas serão classificadas, lavadas em água deionizada e deixadas em papel de filtro molhado, então secas em papel filtro e pesadas com uma balança eletrônica de precisão, sendo imediatamente devolvidas ao substrato correspondente.

Os pesos das minhocas (biomassa) nos diferentes grupos de concentração testadas serão relatados a partir do início do período de exposição e serão usados para calcular a inibição do crescimento.

Capacidade reprodutiva de *Eisenia foetida*.

Para avaliação da capacidade reprodutiva (fecundidade), serão analisados a produção de casulos e a eclodibilidade durante 56 dias. Após o período de exposição de 28 dias, as minhocas serão retiradas do substrato, contadas, limpas com água deionizada, suavemente secadas em papel filtro e posteriormente pesadas.

Neste momento, também serão contados manualmente o número de casulos produzidos em cada repetição. O substrato com os casulos será devolvido para os recipientes de ensaio para permitir a eclosão dos casulos por um período adicional de 28 dias, conforme recomendações de OECD (2004).

Para contar o número de juvenis produzidos, os recipientes de ensaio são colocados em um banho de água inicialmente a uma temperatura de 40°C, e em seguida elevada para 60°C. Após um período de cerca de 20 minutos as minhocas juvenis aparecem na superfície das amostras e serão cuidadosamente retiradas para um frasco separado e contadas manualmente OECD (2004).

Avaliação de marcadores bioquímicos em *Eisenia foetida*.

Preparo das amostras

Antes das análises bioquímicas, as minhocas serão incubadas sem alimentação por dois dias em papel de filtro Whatman n^o 1 umedecido, à temperatura ambiente para esvaziar seu conteúdo do trato digestivo, conforme (REINECKE e REINECKE 2007).

As amostras (minhocas) serão coletadas dos recipientes ao término de cada período experimental conforme descrito no desenho experimental e as atividades enzimáticas serão medidas utilizando-se todo o corpo da oligoqueta. As minhocas inteiras, após o esvaziamento digestivo serão congeladas em nitrogênio líquido e em seguida armazenadas à - 20° C até a análise (não superior a uma semana) no Laboratório de Bioquímica Toxicológica – Instituto de Pesquisas Ambientais (IPAE/CCR/URCAMP-Bagé/RS).

Então, as minhocas serão homogeneizadas em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,6) em quatro partes (4:1 peso:volume) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF; 0,1 mM), usando um homogeneizador de tecidos *Heidolph* a 6.000 rpm.

Em seguida, o homogeneizado será centrifugado a 9.000 g por 30 min em uma centrífuga Coleman modelo 90-1, resultando em um sobrenadante (S1) que será utilizado para a medição das atividades enzimáticas. Todos os preparos teciduais serão realizados a 4° C.

Avaliação da enzima acetilcolinesterase

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) será medida utilizando-se o método descrito por Ellman et al. (1961) e adaptado para uso em minhocas. Para este teste, o iodeto de acetiltiocolina será usado como substrato e o ácido 5,5' ditio-bis-2-nitrobenzoato (DTNB) como cromógeno. Na reação o iodeto de acetiltiocolina é hidrolisado pela colinesterase, liberando tiocolina, a qual reage com o DTNB para produzir um ânion amarelo que pode ser detectado espectrofotometricamente a 412 nm.

A atividade enzimática será mensurada cineticamente em um analisador bioquímico de semi-automação *TP Analyzer* - Thermoplate. Para cada célula do espectrofotômetro 680 µL de tampão fosfato (0.02 molL⁻¹, pH7), 40 µL de DTNB (0.01molL⁻¹), 20 µL de sobrenadante (S1) de minhoca e 20 µL de iodeto de acetiltiocolina serão adicionados sucessivamente para iniciar a reação enzimática. A reação será realizada a 25° C e iniciada pela adição do substrato.

Avaliação da enzima glutathione-S-transferase

Glutathione-S-transferase (GST) será medida usando o método descrito por Habig et al. (1974) com CDNB como substrato para a medição espectrofotométrica em 340nm a 25° C, usando um *TP Analyzer - Thermoplate*. Em cada célula UV 840 µL de tampão Tris (0.1molL⁻¹, pH 7), 50 µL de CDNB (20mmolL⁻¹), 10 µL do sobrenadante de minhoca e 100 µL de glutathione (GSH, 20mmolL⁻¹) serão adicionados sucessivamente. A reação será iniciada pela adição de GSH.

Avaliação da enzima α-amilase

Este método baseia-se em Pesce e Kaplan (1987), utilizando-se o substrato GalG2–CNP (2-cloro-4-nitrofenil-galacto piranosil maltodiose) que é diretamente hidrolisado pela enzima α – amilase da amostra produzindo cloronitrofenol (CNP). O CNP absorve luz em 405 nm, e a velocidade de aparecimento da cor é diretamente proporcional à atividade enzimática. Adiciona-se 1,0 mL do reagente contendo Tampão biológico pH 6,00 - 50 mmol/L; Cloreto de sódio – 70 mmol/L; Cloreto de Cálcio 6 mmol/L; GalG2–CNP 2,22 mmol/L em um tubo de ensaio. Em seguida, adiciona-se 20 µL da amostra realizando-se a leitura a 37 °C.

Avaliação da enzima fosfatase alcalina

Neste método, o 4-nitrofenilfosfato é hidrolisado especificamente pela fosfatase alcalina em pH 9,8, liberando o 4-nitrofenol, cuja velocidade de formação, medida em 405 nm, é proporcional à atividade da enzima presente na amostra (GSCC, 1972).

Adiciona-se 0,8 mL do reagente contendo dietanolamina 1 mmol/L pH 9,81; cloreto de magnésio 0,5 mmol/L. 0,2 mL do reagente 4-nitrofenilfosfato 10 mmol/L em um tubo de ensaio. Em seguida, adiciona-se 20 µL da amostra realizando-se a leitura a 37 °C.

Avaliação da enzima catalase

A atividade da catalase (CAT) será determinada pela medição da taxa de redução de peróxido de hidrogênio em 240nm (SAINT-DENIS et al., 1998). As cubetas para UV serão preenchidas com 990 µL de tampão Tris (67 mmolL⁻¹, pH 7,5), 10 µL de sobrenadante de minhoca e 500 µL de H₂O₂ (0,5%) a 30° C, utilizando um espectrofotômetro *Femto 700S*. Para cada atividade da enzima, um branco será utilizado para calibração do espectrofotômetro (sem os homogeneizados de *E. foetida*). Todas as medições serão realizadas em triplicata para cada amostra de minhoca e cada um branco. Os resultados serão expressos em unidades de CAT, onde uma unidade é a quantidade da enzima necessária para oxidar 1 µmol de H₂O₂ por minuto e por mg de proteína, a 30 °C e pH 8.0.

Determinação de proteínas da amostra

O conteúdo de proteínas totais será determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). O ensaio de Bradford baseia-se na ligação do corante *Coomassie blue-250* para proteína com aumento da absorvância em 550nm. A diluição das amostras de tecido será necessária antes da análise (1:100). Assim, a quantidade de proteína pode ser estimada no sobrenadante (S1) de minhoca, por comparação com uma solução padrão de albumina de soro bovino (BSA). A determinação de proteínas da amostra será necessária para o cálculo das atividades enzimáticas que serão expressas em $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteínas. Todas as medições serão realizadas em triplicata.

Teste de lipoperoxidação (ensaio FOX)

Para este teste, as minhocas também serão incubadas sem alimentação por dois dias em placas de Petri com papel de filtro Whatman n° 1 umedecido, à temperatura ambiente para esvaziar seu conteúdo do trato digestivo, previamente às avaliações. Individualmente, minhocas inteiras serão homogeneizadas em homogeneizador de tecidos *Heidolph* (1:9 peso:volume) em 100% de metanol-HPLC gelado (5° C). Em seguida, o homogeneizado será centrifugado a 1.000 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante resultante será utilizado para a medição dos hidroperóxidos lipídicos conforme Hermes-lima et al. (1995) e Monserrat et al. (2003).

O ensaio FOX está baseado na oxidação do Fe^{2+} por lipídios peroxidados em pH ácido na presença de um pigmento complexador de Fe^{3+} , o alaranjado de xilenol. A formação deste complexo pode ser quantificada por espectrofotometria, pelo aumento da absorção a 580 nm. Este ensaio será determinado de acordo com Hermes-lima et al. (1995), com algumas modificações sugeridas por Monserrat et al. (2003). As leituras serão realizadas em um espectrofotômetro Femto 700S no Laboratório de Bioquímica Toxicológica – Instituto de Pesquisas Ambientais e Energia (IPAE – URCAMP, Bagé-RS). Para o ensaio padrão, os seguintes reagentes serão adicionados sequencialmente: 450 μL de FeSO_4 1 mmol.L^{-1} (preparado imediatamente antes do uso), 175 μL de H_2SO_4 a 250 mmol.L^{-1} e 175 μL de laranja de xilenol 1 mmol.L^{-1} (Sigma). Para *Eisenia foetida*, o volume de amostra do extrato tecidual (50 μL) será adicionado e água deionizada suficiente para obter 1000 μL de volume final. Um branco será preparado pela substituição do extrato tecidual por água. As amostras serão incubadas em temperatura ambiente até que a reação se complete (2 horas), e a absorbância será lida em 580 nm. Cumene hidroperóxido (CHP, sigma) será posteriormente adicionado e uma nova leitura em 580 nm será realizada. Os níveis de lipoperoxidação serão expressos em termos de equivalentes de hidroperóxido de cumeno de acordo com Monserrat et al. (2003).

Avaliações microbianas do substrato (esterco bovino).

Biomassa Microbiana

Será avaliada pelo nitrogênio (N) da Biomassa microbiana (N_{mic}) que será determinado pelo método da fumigação-extração com clorofórmio conforme Brookes et al., (1985), utilizando 5g de amostra (peso fresco do vermicomposto). Os extratos filtrados (0,5 M K_2SO_4) tanto das amostras fumigadas e não-fumigadas serão analisadas para o N total extraível. O N total extraído será determinado após oxidação com $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ como descrito por Cabrera e Beare (1993). O N_{mic} será estimado como a diferença entre o N total extraído das amostras fumigadas e das amostras não-fumigadas. Este método tem demonstrado ser adequado e funcionar corretamente com amostras orgânicas a partir de estudos de vermicompostagem (DOMÍNGUEZ et al., 2003; AIRA et al., 2007).

Atividade Microbiana

A atividade microbiana será avaliada através da medida da taxa de evolução de CO_2 a partir da amostra após 6 horas de incubação (respiração basal). O CO_2 evoluído será capturado em 1 Mol L^{-1} de NaOH, então, quantificado por titulação com HCl 1 Mol L^{-1} e um indicador fenolftaleína 1%, após a adição de excesso de BaCl_2 (ANDERSON, 1982).

Atividade da enzima Celulase

A atividade da enzima celulase será determinada pela quantificação dos açúcares redutores liberados após a incubação das amostras (5 g peso fresco do vermicomposto) com sal sódico de carboximetil celulose (0,7%) por 24 horas a 50° C. Os produtos finais serão filtrados e posteriormente lidos em um espectrofotômetro Femto 700S em 690 nm (SCHINNER e von MERSE, 1990).

Atividade da enzima Protease

A atividade da protease será avaliada por determinação dos aminoácidos liberados, após a incubação das amostras (1 g peso fresco do vermicomposto) com caseinato de sódio (2%) por 2 h a 50° C, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Os produtos finais serão filtrados e posteriormente lidos em um espectrofotômetro Femto 700S em 700 nm (LADD e BUTLER, 1972).

Atividade da enzima Fosfatase Alcalina

Atividade da fosfatase alcalina será mensurada por determinação do *p*-nitrofenol (PNP) liberado, após a incubação das amostras (1 g peso fresco do vermicomposto) com *p*-nitrofenil fosfato (0,025 Mol L^{-1})

durante 1 h a 37° C. Os produtos finais serão filtrados e posteriormente lidos em um espectrofotômetro *Femto 700S* a 400 nm (EIVAZI e TABATABAI, 1977; ALEF et al., 1995).

Análise Estatística

Os dados serão analisados utilizando uma ANOVA; posteriormente, quando necessário, serão feitas comparações *post-hoc* (Duncan test) nos experimentos com *Eisenia foetida*. Será explorado também a relação entre a biomassa e a atividade microbiana (Nmic e respiração basal) e as três atividades enzimáticas estudadas no vermicomposto pela análise de correlação. Todas as análises estatísticas serão realizadas utilizando o software SPSS 16.0 e os dados plotados por intermédio do software SigmaPlot 10.0.

3. Resultados e Impactos esperados

A capacidade da *Eisenia foetida* em responder a agentes químicos levou à sua utilização na padronização de vários testes, com resultados muito promissores. Desta forma, diversos ensaios toxicológicos foram desenvolvidos com o propósito de avaliar o efeito de substâncias químicas sobre minhocas desta espécie. Dentro deste contexto, as respostas bioquímicas em organismos frente a agentes estressores ambientais são consideradas como os índices de alerta da poluição no meio ambiente. Neste sentido, muitas atividades enzimáticas têm sido utilizadas como biomarcadores de exposição a uma diversidade de substâncias químicas.

Os testes toxicológicos utilizando *Eisenia foetida* são bastante versáteis, permitindo a avaliação de diversos poluentes e seus impactos sobre diferentes ecossistemas, entretanto pouco se conhece sobre o efeito de fármacos veterinários em *E. foetida* e sobre a atividade microbiana durante o processo de vermicompostagem, principalmente no que se refere as ivermectinas, que são eliminadas juntamente com as fezes bovinas e possuem longa persistência em esterco.

Desta forma, o estudo dos aspectos relacionados com a atividade microbiana e com as respostas bioquímicas em *Eisenia foetida*, utilizando o sistema de vermicompostagem, pode ser promissor no sentido de avaliar o impacto de medicamentos que são eliminados pelas fezes de bovinos possam acarretar ao meio ambiente.

4. Cronograma do Projeto

CRONOGRAMA					
ATIVIDADES	ANO				
	2010	2011	2012	2013	2014
Desenvolvimento e manutenção dos organismos sob as condições metodológicas.	X	X	X	X	
Preparo de soluções e reagentes de trabalho.		X	X X	X	
Aplicação dos ensaios no organismo teste.		X	X X	X X	
Avaliação dos resultados.				X	
Redação de texto para publicação.				X	
Defesa da Tese				X	X

Referências Bibliográficas

- AIRA M., MONROY F., DOMÍNGUEZ J. (2006). *Eisenia foetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) Activates Fungal Growth, Triggering Cellulose Decomposition During Vermicomposting. **Microbial Ecology**, V. 52:738–746
- AIRA M., MONROY F., DOMÍNGUEZ, J.(2007). Microbial Biomass Governs Enzyme Activity Decay during Aging of Worm-Worked Substrates through Vermicomposting. **Journal of Environmental Quality**. 36:448–452
- ALEF, K., P. NANNIPIERI, C.TRAZAR-CEPEDA. (1995) Phosphatase activity. p. 335–344. In K. Alef and P. Nannipieri (ed.) **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. Academic Press, London.
- ALVINERIE, M., SUTRA, J.F., GALTIER, P., LIFSCHITZ, A., VIRKEL, G., SALLOVITZ, J., LANUSSE, C. (1999) Persistence of ivermectin in plasma and faeces following administration of a sustained-release bolus to cattle. **Research in Veterinary Science**. 66:57–61.
- ALY M A S AND SCHRÖDER P. (2008) Effect of Herbicides on Glutathione S-transferases in the Earthworm, *Eisenia fetida*. **Environmental Science Pollution Research** 15 (2) 143 – 149.
- ANDERSON, J.P.E. (1982) Soil respiration. p. 831–871. In A.L. Page and R.H. Miller (ed.) **Methods of soil analysis**. Part 2. Chemical and microbiological properties. 2nd ed. Agron. Monogr. 9. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI.
- ANTONIOLLI Z. I., STEFFEN G.P.K, STEFFEN R. B. (2009). Utilização de casca de arroz e esterco bovino como substrato para a multiplicação de *Eisenia fetida* Savigny (1826). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 824-830, maio/jun.
- AQUINO A. M., ALMEIDA D. L., GUERRA J.G.M. E DE-POLLI, H. (2005) Biomassa microbiana, colóides orgânicos e nitrogênio inorgânico durante a vermicompostagem de diferentes substratos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.40, n.11, p.1087-1093.
- ARUN, S., SUBRAMANIAN, P., (1998). Antioxidant enzymes in freshwater prawn. **Biochem. Physiol. B** 121, 273–277.
- BANSAL S., KAPOOR K.K. (2000). Vermicomposting of crop residues and cattle dung with *Eisenia foetida*. **Bioresource Technology** 73:95-98.
- BARTH, D., HEINZE-MUTZ, E.M., LANGHOLFF, W., RONCALLI, R.A., SCHLUTER, D. (1994) Colonisation and degradation of dung pats after subcutaneous treatment of cattle with ivermectin or levamisole. **Applied Parasitology** 35, 277–293;
- BENÍTEZ, E., H. SAINZ, AND R. NOGALES. (2005). Hydrolytic enzyme activities of extracted humic substances during the vermicomposting of a lignocellulosic olive waste. **Bioresource Technology**. 96:785–790.
- BENÍTEZ, E., H. SAINZ, R. MELGAR, AND R. NOGALES (2002). Vermicomposting of a lignocellulosic waste from olive oil industry: A pilot scale study. **Waste Management Research**. 20:134–142.
- BORGERAAS J, NILSEN K, STRENSSEN J. (1996) Methods for purification of glutathione transferase in the earthworm genus *Eisenia* and their characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Pharmacol Toxicol Endocrinol** 114 (2) 129–140.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry** 72, 248–254. , 1976.
- BROOKES, P.C., A. LANDMAN, G. PRUDEN, AND D.S. JENKINSON. (1985). Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology & Biochemistry** 17:837–842.

- CABRERA, M.L.; M.H. BEARE. (1993) Alkaline persulfate oxidation for determining total nitrogen in microbial biomass extracts. **Soil Sci. Soc. Am. J.** 57:1007–1012.
- CAPOWIEZ Y., RAULT M., MAZZIA C., BELZUNCES L. (2003) Earthworm behaviour as a biomarker – a case study using imidacloprid. The 7th international symposium on earthworm ecology · Cardiff · Wales · 2002. **Pedobiologia** 47, 542–547.
- CARREIRO, M.M., R.L. SINSABAUGH, D.A. REPERT, AND D.F. PARKHURST. (2000). Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. **Ecology** 81:2359–2365.
- CHEN C., ZHOU Q., LIU S., XIU, Z. (2011) Acute toxicity, biochemical and gene expression responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks. **Chemosphere** 83:1147–1154
- DENOYELLE, R., RAULT, M., MAZZIA, C., MASCLE, O., CAPOWIEZ, Y. (2007) Cholinesterase activity as a biomarker of pesticide exposure in *Allolobophora chlorotica* earthworms living in apple orchards under different management strategies. **Environmental Toxicology and Chemistry** 26, 2644–2649.
- DEPLEDGE, M.H., FOSSI, M.C. (1994) The role of biomarkers in environmental assessment. 2. Invertebrates. **Ecotoxicology** 3, 161–172.
- DIAO X, JENSEN J, HANSEN A D. (2007). Toxicity of the anthelmintic abamectin to four species of soil invertebrates. **Environmental Pollution** 148:514-519.
- DOMÍNGUEZ, J. (2004). State of the art and new perspectives in vermicomposting research. p. 401–425. In C.A. Edwards (ed.) **Earthworm ecology**. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- DOMÍNGUEZ, J., R.W. PARMELEE, AND C.A. EDWARDS. (2003) Interactions between *Eisenia andrei* (Oligochaeta) and nematode populations during vermicomposting. **Pedobiologia** 47:53–60.
- EDWARDS, C.A.; ARANCON, N.Q. (2004). The use of earthworms in the breakdown of organic wastes to produce vermicompost and animal feed protein. p. 345–380. In C.A. Edwards (ed.) **Earthworm ecology**. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- EIVAZI, F., M.A. TABATABAI. (1977) Phosphatases in soils. **Soil Biology & Biochemistry** 9:167–172.
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES JR, V.V., FEATHERSTONE, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology** 7, 88–95.
- ELVIRA C., SAMPEDRO, BENÍTEZ; NOGALES R. (1998). Vermicomposting of sludges from paper mill and dairy industries with *Eisenia andrei*: a pilot-scale study. **Bioresource Technology** 63 205-211
- FLOATE KD. (1998) Off-target effects of ivermectin on insects and on dung degradation in southern Alberta, Canada. **Bulletin of Entomology Research** 88:25–35.
- GAETE H., HIDALGO M. E. NEAMAN A.; ÁVILA G. (2010) Evaluación de la toxicidad de cobre en suelos a través de biomarcadores de estrés oxidativo en *eisenia foetida*. **Quimica Nova**, Vol. 33, No. 3, 566-570.
- GAO Y., et al. (2007a) Effect of albendazole anthelmintics on the enzyme activities of different tissue regions in *Eisenia fetida*. **European Journal of Soil Biology** 43:S246-S251,
- GAO Y., et al. (2007b) Toxic effects of albendazole on adenosine triphosphatase activity and ultrastructure in *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 67: 378–384.
- GARG P., GUPTA A, SATYA S. (2006). Vermicomposting of different types of waste using *Eisenia foetida*: A comparative study. **Bioresource Technology** 97 391–395
- GARG, V.K.; GUPTA, R. (2009). Vermicomposting of agro-industrial processing waste. Chapter 24. In: POONAM SINGH NEE'NIGAM, ASHOK PANDEY. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation Utilisation of Agro-Residues**. Springer Science+Business Media B.V; 462p.
- GOLDBERG D.M.; SPOONER RJ (1983). **Methods of Enzymatic Analysis** (Bergmeyer, H.V. Ed.) 3rd edn. vol 3, pp 258-265, Verlag Chemie, Deerfield Beach, Fl.

- GRØNVOLD J., SVENDSEN T. S., KRAGLUND H. O, BRESCIANI J, MONRAD J. (2004) Effect of the antiparasitic drugs fenbendazole and ivermectin on the soil nematode *Pristionchus maupasi*. **Veterinary Parasitology** 124:91–99.
- GSCC - GERMAN SOCIETY FOR CLINICAL CHEMISTRY. (1972) Standard method for determination for alkaline phosphatase (AP) activity. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem.** V.10, p.290.
- GUNADI B., EDWARDS C.A., BLOUNT C. (2003). The influence of different moisture levels on the growth, fecundity and survival of *Eisenia fetida* (Savigny) in cattle and pig manure solids. **European Journal of Soil Biology** 39:19–24.
- GUNN A, SADD JW. (1994) The effect of ivermectin on the survival, behaviour and cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*. **Pedobiologia** 38:327–333.
- HABIG WH, PABST MJ, JAKOBY WB. (1974) Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry** 249(22):7130–7139.
- HACKENBERGER et al. (2008) Effect of temephos on cholinesterase activity in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety** 71:583–589
- HALLEY, B.A., JACOB, T.A., LU, A.Y. (1989) The environmental impact of the use of ivermectine. Environmental effects and fate. **Chemosphere** 18, 1543-1563.
- HERD R., STRONG L., WARDHAUGH K. (1993) Environmental Impact of Avermectin Usage in Livestock (Special issue). **Veterinary Parasitology** 48: 1-344
- HERD, R., SAMS, R.A., ASHCRAFT, S.M. (1996) Persistence of ivermectin in plasma and faeces following treatment of cows with ivermectin sustained-release, pour-on or injectable formulations. **International Journal for Parasitology** 26, 1087–1093.
- HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. **Free Radical Biology & Medicine**, 19: 271-280, 1995.
- HOLTER, P., SOMMER, C., GRØNVOLD, J., MADSEN, M. (1993). Effects of ivermectin treatment on the attraction of dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae and Hydrophilidae) to cow pats. **Bulletin of Entomology**. Res. 83, 53–58.
- IGLESIAS LE. (1998) Colonização de bolos fecais de bovinos tratados com ivermectin durante a época seca em condições simuladas de campo. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Juiz de Fora (MG) Brasil, p 69.
- IGLESIAS, L.E., SAUMELL, C.A., FERNANDEZ, A.S., FUSE, L.A., LIFSCHITZ, A.L., RODRIGUEZ, E.M., STEFFAN, P.E., FIEL, C.A. (2006) Environmental impact of ivermectin excreted by cattle treated in autumn on dung fauna and degradation of faeces on pasture. **Parasitology Research**. 100, 93–102.
- JENSEN, J., KROGH, P.H., SVERDRUP, L.E. (2003) Effects of the antibacterial agents tiamulin, olanquinox and metronidazole and the anthelmintic ivermectin on the soil invertebrate species *Folsomia fimetaria* (Collembola) and *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae). **Chemosphere** 50, 437–443.
- KANEDA, N., YAMASHITA, T., UCHIDA, S., SHIMANO, N., MIYOSHI, M., SASAKI, Y., ENAMI. (2006). Effects of ivermectin in dung pats on earthworm (Megascolecidae) populations and pat degradation in Japanese grassland. **Applied Soil Ecology** 31:280–285.
- KAUSHIK P., GARG V.K. (2003). Vermicomposting of mixed solid textile mill sludge and cow dung with the epigeic earthworm *Eisenia foetida*. **Bioresource Technology** 90 311–316.
- KOLAR, L., KOZUH ERZEN, N., HOGERWERF, L., VANGESTEL, C.A.M. (2008) Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. **Environmental Pollution**. 151, 182–189.
- KROGH, K.A., JENSEN, G.G., SCHNEIDER, M.K., FENNER, K., HALLING-SØRENSEN, B. (2009) Analysis of the dissipation kinetics of ivermectin at different temperatures and in four different soils. **Chemosphere** 75, 1097–1104.

- LACOURSE E J, HERNANDEZ-VADEL M, JEFFERIES J R, SVENDSEN C, SPURGEON D J., BARRETT J., MORGAN A J, KILLE P, BROPHY P M. (2009) Glutathione transferase (GST) as a candidate molecular-based biomarker for soil toxin exposure in the earthworm *Lumbricus rubellus*. **Environmental Pollution** 157 2459–2469.
- LADD, J.N., J.H.A. BUTLER. (1972) Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. **Soil Biology & Biochemistry** 4:19–30.
- LATTUAD C, MORA P, GARVIN M, LOCATI S, ROULAND C (1999) Enzymatic digestive capabilities in geophagus earthworms: Origin and activities of cellulolytic enzymes. **Pedobiologia** 43(6): 842–850
- LIU X., SUN Z., CHONG W., SUN Z, HE C. (2009) Growth and stress responses of the earthworm *Eisenia fetida* to Escherichia coli O157:H7 in an artificial soil. **Microbial Pathogenesis** 46: 266–272
- LOH T.C., LEE Y.C., LIANG J.B., TAN D. (2005). Vermicomposting of cattle and goat manures by *Eisenia foetida* and their growth and reproduction performance. **Bioresource Technology** 96: 11–114.
- LUKKARI T., M. TAAVITSAINEN, M. SOIMASUO, A. OIKARI, J. HAIMI. (2004) Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier metal exposure. **Environmental Pollution** 129: 377-386.
- LUMARET, J.P., ERROUISSI, F. (2002) Use of anthelmintics in herbivores and evaluation of risks for the non target fauna of pastures. **Veterinary Research** 33, 547-562.
- LUO Y R, et al. (2009) The toxic effects of ionic liquids on the activities of acetylcholinesterase and cellulase in earthworms. **Chemosphere** 77:313–318.
- Macrobrachium malcolmsonni during embryonic development. Comp.
- MADSEN M., OVERGAARD NIELSEN B., P. HOLTER, O.C. PEDERSEN, J. BRØCHNER JESPERSEN, K.-M. VAGN JENSEN, J. GRØNVOLD, P. NANSEN. (1990) Treating cattle with ivermectin: effects on the fauna and decomposition of dung pats. **Journal of Applied Ecology**. 27 1–15.
- McKELLAR, Q.A. (1997) Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. **Veterinary Parasitology** 72:413-435.
- McKELLAR, Q.A., BENCHAOUI, H.A. (1996) Avermectins and milbemycins. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics** 19, 331-351.
- MONSERRAT, J M.; GERATACIANO, L A.; PINHO, G L. L. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylenol orange complex formation. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. New York, v. 45, n. 2, p.177-183, aug., 2003.
- MORSELLI, T.B.G.A. 2009.(a) **Minhocultura**. Editora UFPEL-Pelotas RS. 114p.
- MORSELLI, T.B.G.A. 2009.(b) **Resíduos Orgânicos em Sistemas Agrícolas**. Editora UFPEL-Pelotas RS. 228p.
- MOUGIN, C., KOLLMANN, A., DUBROCA, J., DUCROT, P.H., ALVINERIE, M., GALTIER, P. (2003) Fate of the veterinary medicine ivermectin in soil. **Environmental Chemistry Letters**. 1, 131–134.
- OECD - (2004) Organisation for Economic Co-operation and Development. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, V. 1, N. 2, 1-18(18) Test No. 222: April 1984. Adopted – 2004.
- OECD. (1984) Organization for Economic Co-operation and Development, Test 207: earthworm, acute toxicity tests. In: **Organization for Economic Co-operation and Development** (Ed.), OECD Guidelines for testing of chemicals.
- PARK H. W.; KOH K. S., PARK S.C. (1998) Molecular weights and inhibitor sensitivities of alkaline phosphatase isoenzymes from the midgut of the earthworm, *Eisenia andrei*. **Soil Biology and Biochemistry**. V30, n6: 831-832.

- PARK S. C.; PARK H. W.; SMITH T. J. (1996) Expression of alkaline phosphatases during embryonic development and immature stages of the earthworm, *Eisenia Andrei*. **Soil Biology and Biochemistry**. V28, n4-5: 579-582.
- PAUL, E.A., AND F.E. CLARK. (1996). **Soil microbiology and biochemistry**. 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.
- PESCE, A.J.; KAPLAN, L.A. (1987) **Methods in clinical chemistry**. St. Louis: C. V. Mosby,. p. 817-830.
- PIOLA L., FUCHS J., ONETO M.L., BASACK S., GIMÉNEZ R., MASSARO R., PAPA J.C., KESTEN E., CASABÉ N. (2009) Biomarkers for the assessment of chlorpyrifos effects on earthworms and on soil functional parameters. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.44, n.8, p.874-880.
- PRABHA M. L.; JAYARAAJ I. A.; JEYARAAJ R.; RAO S. (2007) Comparative studies on the digestive enzymes in the gut of earthworms *Eudrilus eugenia* and *Eisenia fetida*. **Indian Journal of Biotechnology**. 6:567-569.
- PRAMANIK P; CHUNG Y.R. (2010). Efficacy of vermicomposting for recycling organic portion of hospital wastes using *Eisenia fetida*: standardization of cow manure proportion to increase enzymatic activities and fungal biomass. **Environmentalist** 30:267–272
- RAO, J.V., KAVITHA, P. (2004) Toxicity of azodrin on the morphology and acetylcholinesterase activity of the earthworm *Eisenia foetida*. **Environmental Research**. 96:323–327.
- RAVINDRAN B., DINESH S.L., KENNEDY L. J., SEKARAN G. (2008). Vermicomposting of Solid Waste Generated from Leather Industries Using Epigeic Earthworm *Eisenia foetida*. **Applied Biochem Biotechnol**; 151:480–488.
- REDDY N C. & RAO J V. (2008) Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 71: 574–582.
- REINECKE A. J., VENTER J.M. (1987). Moisture preferences, growth and reproduction of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). **Biology and Fertility of Soils** 3:135-14.
- REINECKE SA, REINECKE AJ. (2007) The impact of organophosphate pesticides in orchards on earthworms in the Western Cape, South Africa. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 66:244–251.
- RIBERA, D., et al. (2001) Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. **Soil Biology and Biochemistry** 33:1123–1130.
- ROMBKE J., KROGH K. A., MOSER T., SCHEFFCZYK A., LIEBIG M. (2009) Effects of the Veterinary Pharmaceutical Ivermectin on Soil Invertebrates in Laboratory Tests. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**.
- SAINT-DENIS M, LABROT F, NARBONNE JF, RIBERA D. (1998) Glutathione, glutathione related enzymes and catalase activities in the earthworms *Eisenia fetida andrei*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 35, 602–614.
- SCAPS P. et al. (1997) Cadmium and Lead Accumulation in the Earthworm *Eisenia fetida* (Savigny) and its Impact on Cholinesterase and Metabolic Pathway Enzyme Activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 116C, No. 3, pp. 233–238.
- SCHIMEL, J.P., AND J. BENNET. (2004). Nitrogen mineralization: Challenges of a changing paradigm. **Ecology** 85:591–602.
- SCHINNER, F., AND W. VON MERSE. (1990) Xylanase, CM-cellulase, and invertase activity in soil: An improved method. **Soil Biology & Biochemistry** 22:511–515.
- SHOOP, W.L., MROZIK, H., FISHER, M.H. (1995) Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Veterinary Parasitology** 59, 139-156.

- SILVA C.D., COSTA L.M., MATOS A.T., CECON P.R.; SILVA, D.D. (2002) Vermicompostagem de lodo de esgoto urbano e bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.6, n.3, p.487-491.
- SINGH J., KAUR A., VIG A.P., RUP, P.J. (2010). Role of *Eisenia fetida* in rapid recycling of nutrients from biosludge of beverage industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 73: 430–435
- SINSABAUGH, R.L. (1994). Enzymic analyses of microbial pattern and process. **Biol. Fertil. Soils** 17:69–74.
- SINSABAUGH, R.L., AND D.L. MOORHEAD. (1994). Resource allocation to extracellular enzyme production: A model for nitrogen and phosphorus control of litter decomposition. **Soil Biology and Biochemistry** 26:1305–1311.
- SOMMER C, BIBBY B.M. (2002) The influence of veterinary medicines on the decomposition of dung organic matter in soil. **European Journal of Soil Biology** 38: 155–159.
- SOMMER C.; STEFFANSEN B. (1993) Changes with time after treatment in the concentrations of ivermectin in fresh cow dung and in cow pats aged in the field. **Veterinary Parasitology** 48: 67-73.
- SOMMER, C., STEFFANSEN, B., NIELSEN, B.O., JENSEN, V., JESPERSEN, K.M.V., SPRINGBORG, J.B., NANSEN, P. (1992) Ivermectin excreted in cattle dung after subcutaneous injection or pouron treatment—concentrations and impact on dung fauna. **Bulletin of Entomology Research**. 82:257–264.
- SONG Y., ZHU L.S., WANG J., WANG J.H., LIU W., XIE H. (2009) DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. **Soil Biology & Biochemistry** 41: 905–909.
- STRONG, L., WALL, R., WOOLFORD, A., DJEDDOUR, D. (1996). The effect of faecally excreted ivermectin and fenbendazole on the insect colonisation of cattle dung following the oral administration of sustained-release boluses. **Veterinary Parasitology**. 62, 253–266.
- SUÁREZ VH, LIFSCHITZ, AL, SALLOVITZ JM, LANUSSE CE. (2003) Effects of ivermectin and doramectin faecal residues on the invertebrate colonization of cattle dung. **Journal of Applied Entomology** 127:481–488.
- SUN Y, DIAO X, ZHANG Q, SHEN J. (2005) Bioaccumulation and elimination of avermectin B1a in the earthworms (*Eisenia fetida*). **Chemosphere** 60:699–704.
- SVENDSEN, T.S., GRØNVOLD, J., HOLTER, P., SOMMER, C. (2003) Field effects of ivermectin and fenbendazole on earthworm populations and the disappearance of dung pats from bolus-treated cattle. **Applied Soil Ecology** 24:207–218.
- VALENTE, B.; MORSELLI, T.B.G.A. (1996). Variação populacional de *Eisenia foetida* em diferentes misturas de resíduos orgânicos oriundos da propriedade rural. In: **Congresso da Pós-Graduação em Ciências Agrárias**, 1, 1996, Pelotas. Resumos... Pelotas: UFPel., v.1, p.105.
- WALL R, STRONG L. Environmental consequences of treating cattle with the antiparasitic drug ivermectin. **Nature** 327:418–421; 1987.
- WARDHAUGH, K.G., MAHON, R.J. (1991). Avermectin residues in sheep and cattle dung and their effects on dung-beetle (Coleoptera:Scarabaeidae) colonization and dung burial. **Bulletin of Entomology Research**. 81, 333–339.
- WISLOCKI, P.G., GROSSO, L.S., DYBAS, R.A. (1989) Environmental aspects of abamectin use in crop protection. In: Campbell, W.C. (Ed.), Ivermectin and Abamectin. Springer Verlag, New York, pp. 182-200.
- WRATTEN, S.D., MEAD-BRIGGS, M., GETTINBY, G., ERICSSON, G., BAGGOTT, D.G. (1993) An evaluation of the potential effects of ivermectin on the decomposition of cattle dung pats. **Veterinary Record**. 133, 365–371.
- XUE Y.; GU X.; WANG X.; SUN C.; XU X.; SUN J.; ZHANG B. (2009) The hydroxyl radical generation and oxidative stress for the earthworm *Eisenia fetida* exposed to tetrabromobisphenol A. **Ecotoxicology** 18:693–699.

YADAV A., GARG V.K. (2011). Recycling of organic wastes by employing *Eisenia fetida*. **Bioresource Technology** 102 2874–2880

ZAMBARE V. P., PADUL M. V., YADAV A. A. AND SHETE T. B. (2008) Vermiwash: biochemical and microbiological approach as ecofriendly soil conditioner. **ARPN Journal of Agricultural and Biological Science** V 3, N4

4. Relatório do trabalho de campo



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PESQUISA



RELATÓRIO DE PROJETO DE PESQUISA

- Relatório Final
 Solicitação de Prorrogação
NÃO É NECESSÁRIO ANEXAR ATAS

Título do Projeto: Avaliação do impacto da ivermectina sobre a *Eisenia foetida* (Oligochaeta) e a atividade microbiana durante o processo de vermicompostagem de esterco bovino.

Código no COCEPE:

Coordenador: Tânia Beatriz Gamboa Araújo Morselli

Unidade: Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel

Departamento: Departamento de Solos

Início: 2010

Término: 2013

Período de Prorrogação:

Nº de prorrogações solicitadas:

PRINCIPAIS RESULTADOS -

Não houve efeitos negativos da ivermectina sobre a mortalidade de minhocas, da mesma forma, as características químicas e a atividade microbiana do vermicomposto não foram afetados. Os resultados mostram que o teste de fuga não foi suficiente para determinar a toxicidade da ivermectina para *Eisenia foetida* em esterco bovino. No entanto, uma resposta hormética foi registrada em relação ao crescimento e a atividade relativa das enzimas acetilcolinesterase, catalase e fosfatase alcalina em minhocas. Além disso, os resultados mostram valores diminuídos da atividade enzimática da glutathione-S-transferase e aumento dos níveis de hidroperóxidos, em resposta às concentrações mais elevadas de ivermectina ao fim de 7 dias de tratamento. Por outro lado, depois de 28 dias, a atividade da glutathione-S-transferase foi significativamente aumentada ($p < 0,01$) nas exposições a 50 mg kg^{-1} e 100 mg kg^{-1} . Portanto, pode-se concluir com presente estudo que a exposição aguda à elevadas concentrações de ivermectina ocasiona dano celular em minhocas. Adicionalmente, a presença da hormese induzida pela ivermectina em minhocas pode estar relacionada a ativação de vias de adaptação.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

- Tuerlinckx, S. M.; Morselli, T. B. G. A.; Huber A. C. K. Utilização de biomarcadores bioquímicos em *Eisenia foetida* (oligochaeta) para ensaios de ecotoxicidade. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Enviar em março de 2014.
- Tuerlinckx, S. M.; Morselli, T. B. G. A.; Huber A. C. K. Effects of ivermectin on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia fetida* (annelida, oligochaeta). **Ciência e Agrotecnologia**. Enviar em março de 2014.
- Tuerlinckx, S. M.; Morselli, T. B. G. A.; Huber A. C. K. Ivermectina induz hormese sobre *Eisenia foetida* durante o processo de vermicompostagem de esterco bovino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Enviado em fevereiro de 2014.
- Tuerlinckx, S. M.; Morselli, T. B. G. A.; Huber A. C. K. Uso do teste de fuga para avaliar a sensibilidade de *Eisenia foetida* (Annelida, Oligochaeta) à ivermectina em esterco bovino. **Revista Científica Rural**. Enviar em março de 2014.

O Coordenador declara, formalmente, que:

- a) são verídicas as informações contidas na presente solicitação de prorrogação;
- b) se responsabiliza pelo encaminhamento do presente pedido de prorrogação para aprovação em reunião de Departamento e no Conselho Superior da unidade.

CIENTE:

Chefe do Departamento

Diretor Conselho Departamental

1 **5. ARTIGO 1**

2

3 **UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM *Eisenia foetida***
4 **(OLIGOCHAETA) PARA ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE.**5 Sandro Moreira Tuerlinckx¹; Tânia Beatriz Gamboa Araujo Morselli²; Ana Cláudia Kalil
6 Huber³.7 **RESUMO**

8

9 A entrada de metais pesados e agrotóxicos no solo pode resultar em alterações bioquímicas nos
10 organismos vivos. Neste contexto, as minhocas têm sido estudadas como uma espécie teste de
11 fácil manutenção e baixo custo, prontamente disponíveis para a avaliação da poluição química. O
12 objetivo deste trabalho foi fornecer dados básicos sobre os biomarcadores bioquímicos do
13 anelídeo *Eisenia foetida*. Os métodos para medição de cinco enzimas- aspartato aminotransferase
14 (AST), amilase (AMIL), fosfatase alcalina (FALC), acetilcolinesterase (AChE) e da glutationa-
15 S-transferase (GST) foram otimizados. Além disso, o ensaio oxidação do íon ferroso/laranja de
16 xilenol (FOX) foi adaptado para mensurar os níveis de hidroperóxidos lípidos (LPO) em tecidos
17 de *Eisenia foetida*. As atividades da AST, AMIL e FALC foram comparativamente mais
18 elevadas ($P < 0,05$) do que a AChE e GST em minhocas sob condições de laboratório. As *Eisenia*
19 *foetida* na presença do fluido celomático (CF) apresentaram maiores níveis de LPO em
20 comparação com minhocas na ausência de CF. Através dos dados analisados foi verificado que
21 as minhocas da espécie *Eisenia foetida* mantidas em uma cultura padronizada apresentam
22 atividade das enzimas estudadas e níveis de hidroperóxidos e que os resultados são reproduzíveis
23 sob as condições de ensaio em estudo.

24

25 Termos para indexação: enzimas, hidroperóxidos lipídicos, minhocas, toxicologia.

26

27

28 **USE OF BIOCHEMICAL BIOMARKERS IN *Eisenia foetida* (Oligochaeta) FOR**
29 **ECOTOXICITY ASSAYS.**

30

31 **SUMMARY**

32

33 The input of heavy metals and agrochemicals in the soil compartment can results in biochemical
34 changes for living organisms. In this context, earthworms have been studied as a readily

35 available, easily maintainable and cheap test species for assessing chemical pollution. The aim of
36 this work was to provide basic data on the biochemical biomarkers in the annelid *Eisenia foetida*.
37 Methods for measurement of five enzymes—aspartate aminotransferase (AST), amylase
38 (AMIL), alkaline phosphatase (FALC), acetylcholinesterase (AChE) and of glutathione-S-
39 transferase (GST) were optimized. In addition, the ferrous oxidation/xylenol orange (FOX) assay
40 was adapted to measure lipid hydroperoxides levels (LPO) in *Eisenia foetida* tissues. The activities
41 of AST, AMIL and FALC are comparatively higher ($P < 0.05$) than AChE and GST in
42 earthworms under laboratory conditions. The *Eisenia foetida* in the presence of coelomic fluid
43 (CF) showed the highest LPO levels compared with earthworms in the absence of CF. Through
44 the analyzed data was verified that the earthworms *Eisenia foetida* species kept in a standardized
45 culture present activity of enzymes and hydroperoxide levels and that the results are reproducible
46 under our test conditions.

47
48 Index terms: enzymes, lipid hydroperoxides, earthworms, toxicology.

50 **INTRODUÇÃO**

51
52 Minhocas agem como engenheiros de ecossistemas atuando em processos que ocorrem no
53 solo, influenciando as propriedades físicas, químicas e biológicas. Elas são, portanto, organismos
54 modelo usados em testes de toxicidade terrestre, possuindo aplicação destacada como
55 indicadores de níveis de estresse e da sustentabilidade de ecossistemas (Buckerfield et al., 1997;
56 Gorres et al., 2001).

57 Entre as várias espécies de minhocas, a *Eisenia foetida* foi estabelecida como a mais
58 comumente empregada para a padronização de ensaios de ecotoxicidade (OECD 1984, ISO
59 1993), pois podem ser facilmente cultivadas em laboratório e são sensíveis a uma vasta gama de
60 produtos tóxicos (Lowe & Butt, 2007; Yasmin & D'Souza, 2007).

61 Neste sentido, a utilização de marcadores bioquímicos neste organismo tem sido
62 empregada nos últimos anos para investigar contaminantes e seus potenciais de toxicidade,
63 metabolização ou detoxificação, principalmente como uma ferramenta para o monitoramento
64 ambiental (Reinecke & Reinecke, 2007; Rizwan-ul-haq et al., 2012; Velki & Hackenberger,
65 2013). Entre os biomarcadores disponíveis, a atividade da acetilcolinesterase é amplamente
66 usada para monitorar especificamente os efeitos de agentes anticolinesterásicos (Rao et al., 2003;
67 Gambi et al., 2007) e atualmente, já está caracterizada para diversas espécies de minhocas
68 (Caselli et al., 2006; Rault et al., 2007).

69 Enzimas pertencentes as vias de destoxificação celular também são especialmente
70 utilizadas para detectar toxicidade em diferentes ambientes (Sheehan et al., 2001). Dentro desta

71 classe, destacam-se as glutationa-S-transferases, envolvidas na eliminação de compostos
72 citotóxicos e genotóxicos e na prevenção de danos oxidativos aos tecidos (Frova 2006; Aly &
73 Schroder, 2008; Lacourse et al., 2009; Lannutti et al., 2012). As características bioquímicas
74 destas enzimas em minhocas da espécie *Eisenia foetida* foram demonstradas em estudos
75 desenvolvidos por Borgeraas et al. (1996) e Saint-Denis et al. (1998).

76 Metabolicamente, as minhocas pertencentes ao filo Annelida são estruturadas para
77 hidrolisar carboidratos (Prat et al., 2002). Particularmente, em *Eisenia foetida* foram
78 caracterizadas e purificadas duas enzimas digestivas do tipo α -amylases (Ueda et al., 2008). Da
79 mesma forma, a fosfatase alcalina, envolvida na hidrólise de ésteres de monofosfatos orgânicos,
80 foi descrita por Park et al. (1998) no intestino de espécies do gênero *Eisenia*.

81 As aminotransferases são enzimas que possuem um importante papel no metabolismo do
82 nitrogênio em diversas espécies, pois catalisam a primeira etapa no catabolismo de aminoácidos
83 e direcionam a excreção do nitrogênio na forma de amônia e uréia (Campbell & Farrell, 2009).
84 Além disso, as minhocas excretam o nitrogênio oriundo de seu metabolismo na forma de uréia e
85 amônia, entretanto, até o presente momento, são raros os trabalhos que demonstram a atividade
86 das aminotransferases em oligoquetas (Scaps et al., 1997; Whalen et al., 2000).

87 Os ensaios de lipoperoxidação (LPO) que quantificam os níveis de hidroperóxidos
88 lipídicos servem como biomarcadores do estresse oxidativo em organismos expostos à
89 substâncias químicas diversas, produtos tóxicos e a estressores ambientais (Bou et al., 2008).

90 De acordo com Jiang et al. (1991) o ensaio FOX é baseado na oxidação do Fe^{2+} por
91 hidroperóxidos lipídicos em condições ácidas, sendo, então, complexado com o alaranjado de
92 xilenol e adaptado para extratos de tecidos heterogêneos de animais endotérmicos mostrou ser
93 um método rápido e preciso para medir a lipoperoxidação (Hermes-Lima et al., 1995). Também
94 foi demonstrado que a aplicação do ensaio FOX é adequado e rápido como um método de
95 detecção da lipoperoxidação em tecidos de invertebrados (Monserrat et al., 2003). Embora o
96 método FOX seja amplamente utilizado com a finalidade de avaliar a lipoperoxidação nos mais
97 diversos sistemas biológicos (Gay & Gebicki, 2003; Bou et al., 2008), não há relatos na literatura
98 sobre o emprego deste ensaio na oligoqueta *Eisenia foetida*.

99 Deve-se distinguir a resposta normal de um organismo para manter a sua homeostase de
100 uma resposta do organismo estressado ou adversamente afetado (Calzolari et al., 2007). Assim, é
101 necessário uma investigação experimental sobre o perfil de variação da expressão do
102 biomarcador não relacionada aos contaminantes (Jansen et al., 2006; Wenk & Fernandis, 2007).

103 Neste sentido, a manutenção das minhocas antes da instalação de um teste de toxicidade é
104 de fundamental importância, necessitando de uma adequada padronização, pois as atividades
105 enzimáticas em minhocas são influenciadas pelo estado fisiológico, idade e tipo de substrato

106 (Prabha et al., 2007; Rodriguez-Castellanos & Sanchez-Hernandez, 2007). Portanto, diversos
107 protocolos (OECD, 2004; ABNT, 2007; ISSO, 2008) são recomendados para a manutenção das
108 culturas em laboratório.

109 Até o momento, poucos trabalhos foram realizados no Brasil utilizando enzimas ou
110 hidroperóxidos lipídicos como marcadores bioquímicos envolvendo a *Eisenia foetida* como
111 organismo bioindicador. Assim, o objetivo do presente estudo foi aplicar metodologias
112 enzimáticas e de níveis de hidroperóxidos, por intermédio de um analisador bioquímico de
113 semiautomação, para minhocas da espécie *Eisenia foetida* mantidas em cultivo com substrato
114 padronizado em laboratório.

115

116 **MATERIAIS E MÉTODOS**

117

118 **Organismos teste e manutenção da cultura**

119 A escolha do organismo teste, as condições para a sua manutenção no laboratório, e os
120 requisitos para a sua utilização nos ensaios foram baseados em protocolos estabelecidos na
121 literatura (OECD 2004, ISO 2008, Nunes & Espíndola, 2012).

122 Lotes de minhocas *Eisenia foetida* (Lumbricidae, Annelida) foram obtidas a partir do
123 Minhocário da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL – Pelotas/RS) e posteriormente
124 multiplicadas no minhocário da Universidade da Região da Campanha (URCAMP – Bagé/RS).
125 Então, foram selecionadas 100 minhocas adultas e com clitelo desenvolvido para dar início a
126 uma cultura colocada em substrato de manutenção no Laboratório de Bioquímica e Toxicologia
127 Animal – Centro de Ciências Rurais/URCAMP – Bagé/RS, Brasil.

128 O substrato de manutenção foi constituído de pó de fibra de coco e esterco bovino seco a
129 110⁰ C (50: 50 v/v) em estufa modelo Orion 515 – FANEM/SP. A mistura foi colocada em
130 caixas de material plástico resistente, com capacidade para 1000g do substrato seco e acrescido
131 de água destilada para atingir 70% de umidade.

132 A fibra de coco utilizada foi o substrato pó, adquirido da empresa Projeto Coco Verde,
133 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Antes da utilização, o substrato pó foi sujeito a desfaunização
134 mediante a aplicação de pelo menos dois ciclos de congelamento e descongelamento de 48 h.

135 O pH do substrato de manutenção foi ajustado e monitorado regularmente para $6,5 \pm 0,5$
136 por adição suficiente de CaCO₃ quando necessário. A umidade foi ajustada e monitorada
137 visualmente uma vez por semana. Os organismos foram alimentados quinzenalmente com uma
138 dieta suplementada com farinha de aveia pré-cozida em água destilada.

139 Então, a cultura foi mantida a $20 \pm 2^\circ \text{C}$ sob condições padronizadas de temperatura (20°
140 $\pm 2^\circ\text{C}$), em ciclo 12 h luz/12 h escuro com intensidade luminosa de 400–800 *lux* e umidade de
141 75% em câmara climatizada modelo 347 CDG – FANEM/SP.

142 As minhocas utilizadas nos experimentos foram adultas com clitelo desenvolvido, obtidas
143 a partir da cultura padronizada, com pelo menos três meses de idade, mas não mais que um ano e
144 com pesos individuais variando entre 300 e 600 mg.

145

146 **Avaliações enzimáticas na *Eisenia foetida***

147

148 ***Preparo das amostras***

149

150 Antes da realização das análises bioquímicas, as minhocas foram retiradas do substrato de
151 manutenção 24 h antes do início dos testes, selecionadas e armazenadas em placas de Petri sobre
152 papel filtro Whatman nº 1 umedecido, sob temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ com luz 12:12 h: ciclo claro-
153 escuro, para esvaziamento do conteúdo do trato digestório (Reinecke & Reinecke, 2008) no
154 Laboratório de Bioquímica e Toxicologia Animal – CCR/URCAMP-Bagé, RS.

155 Posteriormente, as minhocas ($n = 20$) foram individualmente homogeneizadas em tampão
156 Tris-HCl ($0,1 \text{ Mol L}^{-1}$, pH 7,6) em quatro partes (4:1 peso:volume), contendo fluoreto de
157 fenilmetilsulfonil (PMSF; $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) como inibidor de proteases, usando um
158 homogeneizador de tecidos *Heidolph* a 6.000 rpm. Em seguida, o homogeneizado foi
159 centrifugado a 3.000 g por 30 min em uma centrífuga Coleman modelo 90-1, resultando em um
160 sobrenadante (S1) que foi utilizado para a medição das atividades enzimáticas. Todos os
161 preparos teciduais foram realizados a 4°C .

162

163 ***Avaliação da enzima acetilcolinesterase***

164 A atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi medida conforme o método de Ellman et al.
165 (1961) e adaptada para uso em minhocas. Para este teste, o iodeto de acetiltiocolina foi usado
166 como substrato e o ácido 5,5' ditio-bis-2-nitrobenzoato (DTNB) como cromógeno. Na reação o
167 iodeto de acetiltiocolina é hidrolisado pela colinesterase, liberando tiocolina, a qual reage com o
168 DTNB para produzir um ânion amarelo que pode ser detectado espectrofotometricamente a 412
169 nm.

170 A atividade enzimática, foi então mensurada cineticamente, utilizando-se no ensaio 1000
171 μL de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0), $50 \mu\text{L}$ de DTNB ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$), $50 \mu\text{L}$ de
172 sobrenadante (S1) de minhoca em diferentes diluições e $50 \mu\text{L}$ de iodeto de acetiltiocolina

173 (0,01mol L⁻¹) adicionados sucessivamente. A reação foi realizada a 25⁰ C e iniciada pela adição
174 do substrato.

175 Efetuou-se a leitura de absorvância em λ 412 nm aos 30; 60; 90 e 120 segundos e
176 verificou-se a linearidade do aumento da absorvância em função do tempo. A atividade da
177 acetilcolinesterase foi expressa em $\mu\text{moles mg prote\u00edna}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

178

179 *Avaliação da enzima glutationa-S-transferase*

180 A glutationa-S-transferase (GST) foi avaliada usando o CDNB como substrato para a
181 medição espectrofotométrica em 340nm a 25° C, de acordo com Habig et al. (1974). A atividade
182 enzimática, foi então mensurada utilizando-se no ensaio 960 μL de tampão Tris (0.1mol L⁻¹, pH
183 7), 10 μL de CDNB (100mmol L⁻¹), 10 μL de glutationa (GSH, 100mmol L⁻¹) e 20 μL do
184 sobrenadante de minhoca foram adicionados sucessivamente. A reação foi iniciada pela adição
185 de GSH.

186 Uma unidade da GST foi calculada como μmol de CDNB conjugado por mg de prote\u00edna
187 (U mg⁻¹ prote\u00edna), usando o coeficiente de extinção molar de 9,6 mM⁻¹ cm⁻¹. A atividade
188 enzimática foi então expressa em Unidades de GST/mg prote\u00ednas.

189

190 *Avaliação da enzima α -amilase*

191 Este método baseia-se na utilização do substrato GalG2-CNP (2-cloro-4-nitrofenil-
192 galacto-piranosil maltodiose) que é diretamente hidrolisado pela enzima α – amilase da amostra
193 produzindo cloronitrofenol (CNP), conforme descrito por Winn-Deen et al. (1988). O CNP
194 absorve luz em 405 nm, e a velocidade de aparecimento da cor é diretamente proporcional à
195 atividade enzimática.

196 Para o ensaio adicionou-se 1000 μL do reagente contendo Tampão biológico pH 6,00 - 50
197 mmol L⁻¹; Cloreto de s\u00f3dio – 70 mmol L⁻¹; Cloreto de C\u00e1lcio 6 mmol L⁻¹; GalG2-CNP 2,22
198 mmol L⁻¹ em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 20 μL de diferentes dilui\u00e7\u00f5es da
199 amostra realizando-se a leitura a 37 °C. A atividade da enzima α -amilase foi expressa como μmol
200 CNP mg⁻¹ prote\u00edna min⁻¹. O teste foi conduzido utilizando-se kit bioqu\u00edmico da Biot\u00e9cnica Ltda.

201

202 *Avaliação da enzima fosfatase alcalina*

203 Neste método, o *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP) é hidrolisado especificamente pela fosfatase
204 alcalina em pH 9,8, liberando o *p*-nitrofenol (PNF), cuja velocidade de formação, medida em
205 405 nm, é proporcional à atividade da enzima presente na amostra (Tietz et al., 1983).

206 Adicionou-se 800 μL do reagente contendo dietanolamina 1 mmol L^{-1} pH 9,81; cloreto de
207 magnésio 0,5 mmol L^{-1} e 200 μL do reagente *p*-nitrofenilfosfato 10 mmol L^{-1} em um tubo de
208 ensaio. Em seguida, adicionou-se 20 μL da amostra em diferentes diluições realizando-se a
209 leitura a 37 °C. A atividade enzimática foi então mensurada cineticamente e expressa como μmol
210 PNF mg^{-1} proteína min^{-1} . O teste foi conduzido utilizando-se kit bioquímico da Biotécnica Ltda.

211

212 *Avaliação da enzima aspartato aminotransferase*

213

214 A enzima aspartato aminotransferase (AST) catalisa a transferência de grupos amino da
215 alanina para o α -cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato. Este é reduzido a
216 malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a
217 NAD^+ . A conseqüente redução da absorvância em 340 nm, monitorada
218 espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra
219 (Schumann et al., 2002).

220 Para a determinação da atividade enzimática na presença do piridoxal fosfato, pipetou-se
221 em um tubo 800 μL do reagente contendo tampão TRIS 105 mmol L^{-1} ; L-aspartato 330 mmol L^{-1} ;
222 malato desidrogenase (MDH) ≥ 825 U/L. Em seguida, adicionou-se 100 μL da amostra e incubou-
223 se a 37°C durante 5 minutos. Após esse período de incubação, iniciou-se a medição cinética com
224 a adição de 200 μL do reagente contendo tampão TRIS 20 mmol L^{-1} ; NADH 1320 $\mu\text{mol L}^{-1}$; α -
225 cetoglutarato 66 mmol L^{-1} . A atividade enzimática foi mensurada cineticamente expressa como
226 $\mu\text{mol NADH mg}^{-1}$ proteína min^{-1} . O teste foi conduzido utilizando-se kit bioquímico da
227 Biotécnica Ltda.

228

229 *Cálculos para obtenção das atividades enzimáticas:*

230

231 Para todas as atividades enzimáticas os testes realizados foram ensaios cinéticos
232 utilizando-se um analisador bioquímico de semiautomação termostatizado TP Analyzer -
233 Thermoplate. Os resultados foram calculados utilizando-se um fator obtido em condições ótimas
234 de reação que incluem comprimento de onda específico para cada enzima, cubeta termostatizada
235 com 1,0 cm de espessura de solução, banda de passagem ≤ 2 nm e luz espúria $\leq 0,1\%$. Para a
236 obtenção dos fatores, empregou-se o seguinte cálculo:

237

$$\text{Fator} = \text{VT}/\text{VA} \times \epsilon \times \text{C}$$

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

Em que: **VT** = volume total no meio de reação, **VA** = volume da amostra; **ε** = Coeficiente de absorvidade milimolar específico do produto da reação da enzima analisada, que corresponde o quanto um composto absorve a luz em um dado comprimento de onda, num caminho óptico de 1 cm e na concentração de 1 mmol L⁻¹; e **C** = Caminho óptico da leitura no equipamento, em centímetros.

Com relação à enzima acetilcolinesterase, foi utilizado o $\epsilon_{412\text{nm}}$ para o ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) igual a $13,6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; para o ensaio da enzima glutationa-S-transferase foi empregado o ϵ para o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 9,6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); para a enzima α -amilase em $\epsilon_{405 \text{ nm}} = 13,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o 2-cloro-4-nitrofenil-galacto-piranosil maltodiose (GalG2-CNP); no caso da fosfatase alcalina, utilizou-se para o *p*-NitroFenilFosfato (*p*NPP, $\epsilon_{405 \text{ nm}} = 18,5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e para a enzima aspartato aminotransferase empregou-se para o NADH $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6,3 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Com o propósito de se obter as atividades enzimáticas específicas, efetuaram-se as leituras das absorbâncias, calculando-se a média da variação da absorbância por minuto ($\Delta A/\text{min}$) e multiplicando-se pelo fator obtido para cada enzima, de acordo com a seguinte equação: **Unidades enzimáticas/mL = $\Delta A/\text{min} \times \text{fator}$**

257

258

Então, as atividades enzimáticas específicas foram expressas da seguinte forma:

259

$$\text{AE} (\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}) = \frac{(\text{Unidades enzimáticas}) \times \text{FD}}{\text{mg proteínas}}$$

260

261

262

263

264

Em que: **AE** = atividade específica; **FD** = fator de diluição da amostra; e **mg proteínas** = concentração de proteínas na amostra em mg/mL.

Determinação de proteínas da amostra

265

266

267

268

269

O conteúdo de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976). O ensaio de Bradford baseia-se na ligação do corante *Coomassie blue-250* para proteína com aumento da absorbância em 550nm. A diluição das amostras de tecido foi necessária antes da análise (1:100). Assim, a quantidade de proteína pode ser estimada no sobrenadante (S1) de minhoca, por comparação com uma solução padrão de albumina de soro bovino (BSA). A determinação de

270 proteínas da amostra foi utilizada para o cálculo das atividades enzimáticas. Todas as medições
271 foram realizadas em triplicata.

272

273 **Determinação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos (Ensaio FOX)**

274 Para este teste, adaptou-se o ensaio FOX para o tecido corporal e líquido celomático de
275 *Eisenia foetida*, estabelecendo o tempo de absorção do complexo cromógeno para cada volume
276 de amostra e o tempo de incubação necessário para estabilizar a leitura, conforme determinado
277 por Jiang et al., (1991), Hermes-Lima et al., (1995) e Monserrat et al., (2003).

278 É um método utilizado para se determinar a concentração de hidroperóxidos em amostras
279 biológicas e que utiliza o alaranjado de xilenol, baseando-se no princípio de que os
280 hidroperóxidos oxidam ferro II a ferro III, o qual reage com o alaranjado de xilenol, produzindo
281 um cromóforo que tem absorção máxima em 560 nm (Bou et al., 2008).

282 As minhocas utilizadas neste teste foram adultas com clitelo desenvolvido, obtidas a
283 partir da cultura padronizada. Então, elas foram retiradas do substrato de manutenção 24 h antes
284 do início dos testes, selecionadas e armazenadas em placas de Petri sobre papel filtro úmido sob
285 temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ com luz 12:12 h ciclo claro-escuro, para esvaziamento do conteúdo do
286 trato digestório.

287 Para obter minhocas sem o fluído celomático, foram feitas três lavagens com dois mL de
288 metanol (HPLC-UV) para cada organismo, até não ser mais possível observar a eliminação do
289 celoma.

290 Individualmente, minhocas inteiras foram homogeneizadas (1:9 peso:volume) em 100%
291 de metanol-HPLC gelado (5°C). Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 1.000 g por
292 10 min a 4°C e o sobrenadante resultante utilizado para a medição dos hidroperóxidos lipídicos.
293 O protocolo para a determinação de LPO foi adaptado para um analisador bioquímico de semi-
294 automação (*TP Analyzer* – Thermoplate), empregando 250 μl de FeSO_4 1 mmol L^{-1} , 100 μl de
295 H_2SO_4 250 mmol L^{-1} , 100 μl de laranja de xilenol 1 mmol L^{-1} , e água deionizada para um
296 volume de 900 μl . Diferentes volumes da amostra (25, 50, 75, ou 100 μl) de *E. foetida* foram
297 adicionados e o volume final ajustado para 1000 μl . A absorbância (546 nm) foi registrada em
298 tempos diferentes (0 a 180 min) até a estabilização.

299 Foram preparados brancos de reagente substituindo-se os extratos de tecidos por metanol
300 e também brancos da amostra que são feitos pela substituição do FeSO_4 por H_2O deionizada
301 (Monserrat et al., 2003).

302 Assim, para dar continuidade ao teste construiu-se uma curva de calibração com uma
303 solução de H_2O_2 10mmol/L, obtendo-se, respectivamente, concentrações finais $50\mu\text{mol L}^{-1}$,

304 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 750 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de hidroperóxidos em um volume total de
305 1mL e realizou-se a leitura em analisador bioquímico *TP Analyzer* em λ 546nm após a
306 estabilização da reação.

307 O valor do branco de reagente foi utilizado como *reagent blank* para zerar o
308 equipamento. Determinou-se então a diferença da concentração de hidroperóxidos da amostra e
309 do branco da amostra expressando-se os resultados como equivalentes de hidroperóxidos de
310 lipídios (como substâncias reativas ao FOX) por grama de peso do tecido, usando a seguinte
311 fórmula:

$$312 \quad \text{Hidroperóxidos g tecido}^{-1} = C_A - C_{BA} \times \left(\frac{VF}{VA \times HF} \right)$$

313

314 Em que: C_A = concentração da amostra obtida na curva de calibração, C_{BA} =
315 concentração do branco da amostra obtida na curva de calibração, VF = correspondente ao
316 volume total da reação, VA = correspondente ao volume da amostra utilizado na reação e HF =
317 Fator de homogeneização relativo para o volume de metanol por grama de tecido.

318

319 *Análise estatística*

320 Os testes paramétricos foram precedidos por Shapiro-Wilk para distribuição normal e
321 pelo teste de Levene para a homogeneidade das variâncias. Diferenças significativas nos níveis
322 de hidroperóxidos e atividades enzimáticas específicas foram testadas pela análise de variância
323 (ANOVA), seguidas pelo teste de Duncan quando necessário. As diferenças entre as atividades
324 enzimáticas foram consideradas significantes à $P < 0,05$, utilizando-se o programa IBM SPSS
325 20. A linearidade entre o tempo de incubação e a diluição das amostras foi verificada pela análise
326 de regressão linear.

327

328 **RESULTADOS**

329

330 Foi avaliado a variabilidade de biomarcadores bioquímicos por intermédio de ensaios
331 preconizados na literatura através de um sistema analítico de semiautomação em minhocas
332 *Eisenia foetida* sem a presença de estressores químicos, mantidas em substrato e ambiente
333 padronizado.

334 Os valores obtidos para os coeficientes de variação (c.v.) demonstrados na tabela 1
335 foram: 11,41% (ACHE), 19,97% (AMIL), 8,08% (AST), 19,04% (FALC), 14,27% (GST) e
336 7,88% (LPX).

337

338 Tabela 1. Estatística descritiva e teste de normalidade para os diferentes marcadores bioquímicos
 339 testados em minhocas *Eisenia foetida* ($n = 20$) mantidas em substrato padronizado.
 340

Marcadores bioquímicos	Média	(95%) Intervalo de confiança da média		Desvio padrão	Coeficiente de variação	Teste de normalidade
		Limite inferior	Limite superior			Shapiro-Wilk
ACHE	2,06	1,91	2,21	0,23	11,41%	0,980
AMIL	10,06	8,78	11,34	2,01	19,97%	0,035
AST	9,07	8,60	9,53	0,73	8,08%	0,412
FALC	8,59	7,56	9,64	1,64	19,04%	0,688
GST	1,09	0,99	1,19	0,15	14,27%	0,281
LPX	116	110,19	121,81	9,15	7,88%	0,993

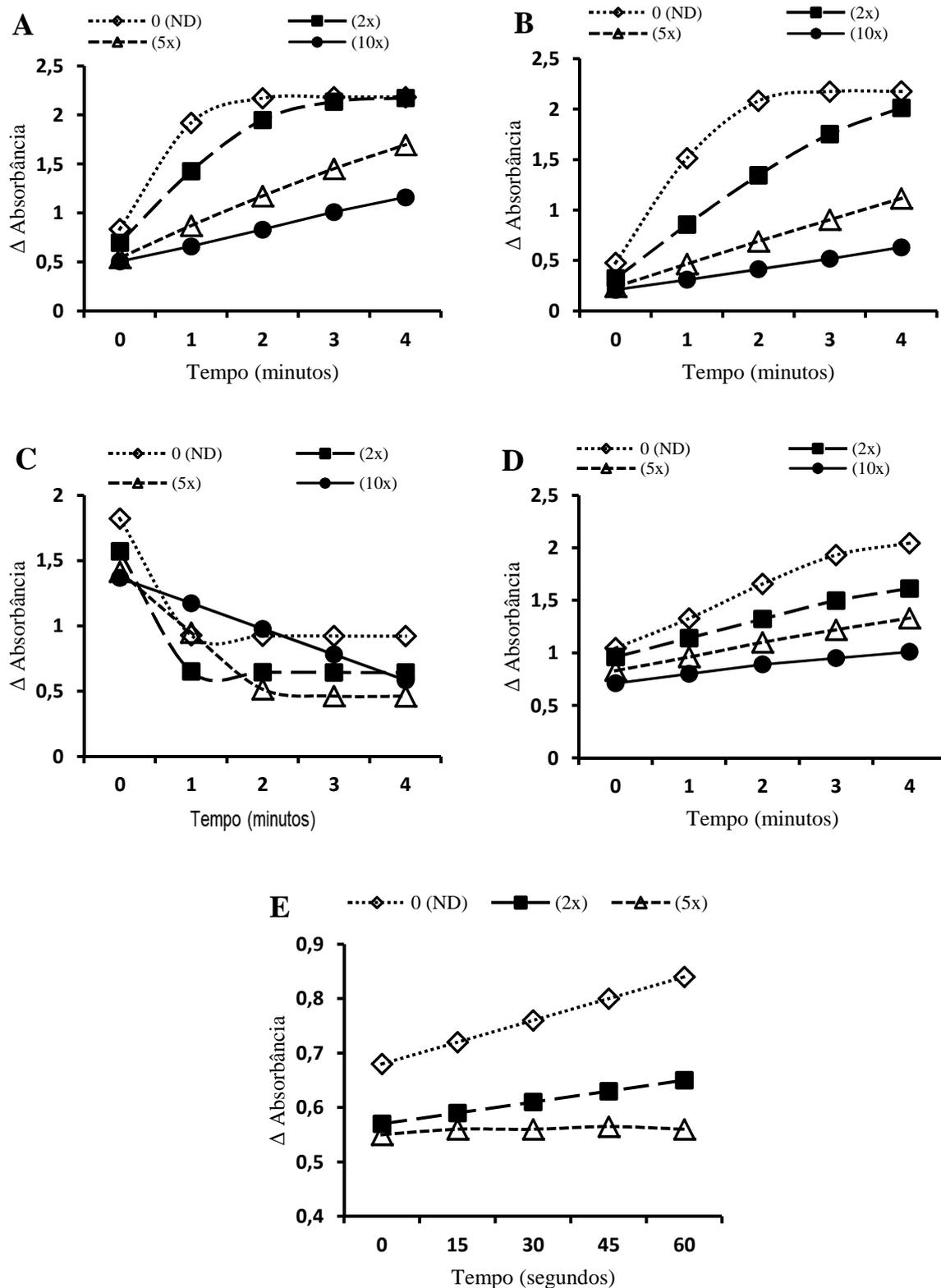
341 ACHE: acetilcolinesterase; AMIL: amilase; AST: aspartato aminotransferase; FALC: fosfatase
 342 alcalina; GST: glutationa-S-transferase; LPX: lipoperoxidação.
 343

344 A condição padronizada utilizada no teste em relação ao substrato, pH, luz, temperatura,
 345 alimentação, idade e peso dos organismos são fundamentais para que os resultados dos
 346 marcadores bioquímicos apresentassem distribuição normal dos dados ($P > 0,05$) e baixos
 347 coeficientes de variação (tabela 1), indicando que os ensaios possuem de boa a alta precisão.

348 Como pode ser observado nas figuras 1 (A – E) foi verificado uma relação linear entre os
 349 valores de absorbância (ABS) e a concentração de proteínas, com a finalidade de determinar a
 350 necessidade de diluição da amostra (S1) para cada enzima testada.

351 A diluição (10x) da amostra foi a que melhor apresentou linearidade para as enzimas
 352 AMIL ($y = 0,116 + 0,003*x$; $r^2 = 0,998$), AST ($y = 1,549 + 0,002*x$; $r^2 = 0,98$) e FALC ($y =$
 353 $0,604 + 0,002*x$; $r^2 = 0,99$). Essa diluição da amostra corresponde a uma concentração de 30,
 354 150 e $30\mu\text{g}$ de proteínas mL^{-1} ($P < 0,0001$), respectivamente, enquanto que para a enzima ACHE
 355 a linearidade ($y = 0,946 + 0,002*x$; $r^2 = 0,99$) foi alcançada como uma diluição (5x), equivalente
 356 a $150\mu\text{g}$ de proteínas mL^{-1} ($P < 0,0001$) e para a GST utilizou-se diretamente o S1, obtendo-se
 357 linearidade ($y = 0,563 + 0,001*x$; $r^2 = 0,991$) para o método ($P < 0,0001$) sem a necessidade de
 358 diluir a amostra ($300\mu\text{g}$ de proteínas mL^{-1}).

359



360

361

362

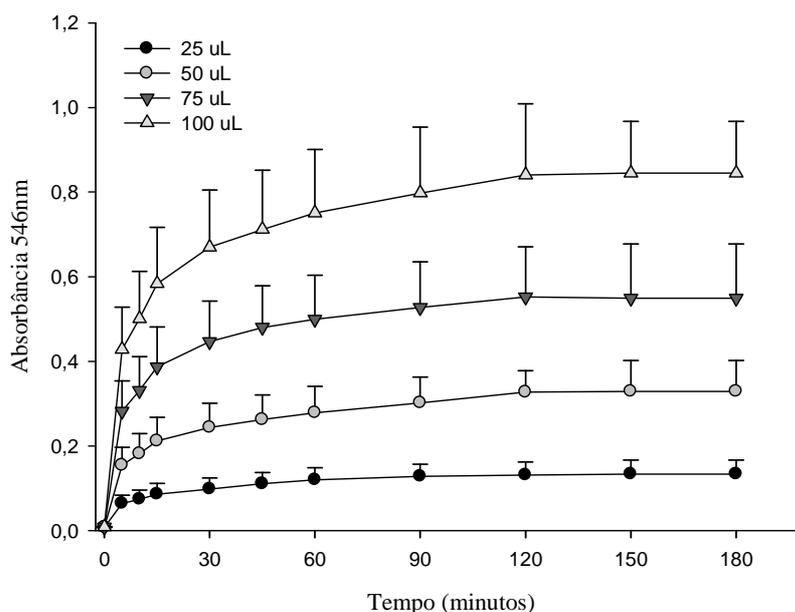
363 Figura 1: Linearidade de absorbância para as enzimas testadas de *Eisenia foetida* ($n = 20$) em
 364 diferentes tempos de incubação e volumes de diluição da amostra. (A) Fosfatase alcalina, (B)
 365 amilase, (C) aspartato aminotransferase, (D) acetilcolinesterase, (E) glutathiona-S-transferase.
 366

367

368 Outro marcador bioquímico investigado neste estudo foi o nível de hidroperóxidos
369 lipídicos pelo teste do alaranjado de xilenol ou ensaio FOX.

370 Como pode-se observar na figura 2 os valores de absorvância (ABS) foram estabilizados
371 após a incubação dos extratos metanólicos de *E. foetida* ($n = 12$) após 120 minutos de incubação
372 à temperatura ambiente, sendo registrados valores de 0.134 ± 0.021 ; 0.325 ± 0.037 ; $0.551 \pm$
373 0.053 e 0.829 ± 0.062 para os volumes de amostra de 25 μl , 50 μl , 75 μl e 100 μl ,
374 respectivamente .

375



376

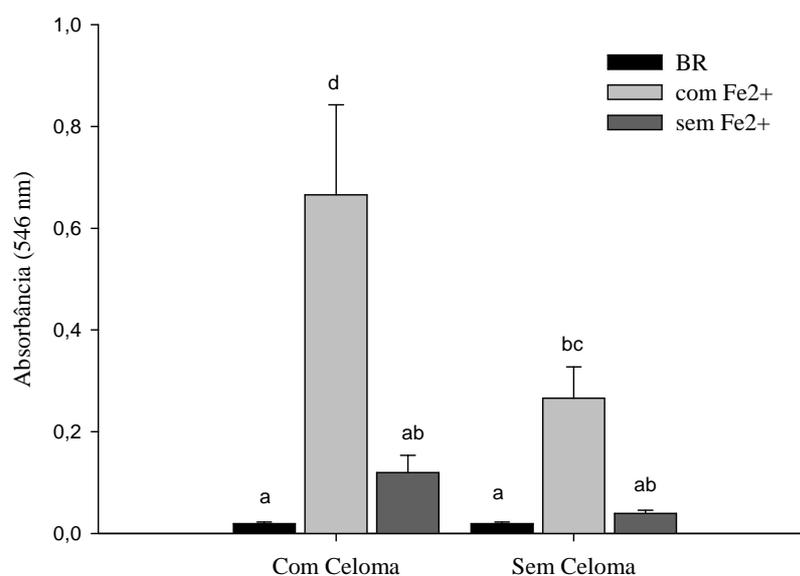
377 Figura 2. Incrementos na absorvância à 546 nm em diversos tempos de incubação e volumes da
378 amostra para o ensaio de lipoperoxidação utilizando o método FOX. Os dados são expressos
379 como média \pm desvio padrão.

380

381 Sendo assim, procurou-se verificar também a influência da presença ou ausência do
382 conteúdo celomático durante o processo de homogeneização sobre os níveis de hidroperóxidos
383 da amostra.

384 Conforme os dados observados na figura 3, é possível concluir que em minhocas com a
385 presença do fluido celomático há um elevado nível de hidroperóxidos ($P < 0,05$), se comparadas
386 com as minhocas em que o líquido celomático foi extraído antes do processo de
387 homogeneização.

388



389

390 Figura 3. Valores de absorbância à 546 nm para o branco de reagente (BR), e amostras de
 391 *Eisenia foetida* com Fe²⁺ e sem Fe²⁺ (branco da amostra) nos ensaio de lipoperoxidação
 392 utilizando o método FOX. Os dados são expressos como média ± desvio padrão.
 393

394 Para este experimento adotou-se uma curva de calibração com H₂O₂ como referência para
 395 calcular o nível de hidroperóxidos. Além disso, utilizou-se também o branco da amostra (sem
 396 Fe²⁺) para a correção da leitura, como sugerido por Monserrat et al. (2003).

397 O branco da amostra dos extratos de *E. foetida* emitiu um pequeno sinal, equivalente a
 398 8,4% da leitura (figura 3) que deve ser subtraído do valor total com Fe²⁺ para a obtenção do valor
 399 real de hidroperóxidos. Na tabela 1 está demonstrado o valor do nível de hidroperóxidos após a
 400 aplicação do cálculo para um volume equivalente a 50µL da amostra (LPX = 116 ± 9,15).

401

402 DISCUSSÃO

403

404 Experimentos de laboratório são necessários para examinar em que medida variáveis
 405 abióticas podem influenciar a flutuação normal de parâmetros bioquímicos em minhocas,
 406 particularmente para biomarcadores relacionados ao metabolismo de pesticidas. Estes estudos
 407 mecanicistas fornecem indicações valiosas sobre interações sinérgicas entre os fatores
 408 ambientais e toxicidade de agentes químicos (Rodriguez-Castellanos & Sanchez-Hernandez,
 409 2007).

410 Os dados para os coeficientes de variação demonstrados na tabela 1, são
 411 comparativamente menores do que os obtidos em outro estudo para *D. magna* (8-33% ACHE e
 412 17-32% GST) e para *P. scaber* (42% GST) (Jemec et al., 2010).

413 Uma menor variabilidade enzimática ocorre em organismos geneticamente idênticos
 414 derivados de uma cultura clonada e que são mantidos sob condições laboratoriais padronizadas
 415 com um constante aporte de alimentos (Jemec et al., 2010). Embora, neste experimento, não se

416 tenha trabalhado com indivíduos clonados, estudos demonstram que ocorrem níveis muito baixos
417 de diferenciação genética entre as populações de cada espécie de *Eisenia* (MCELroy & Diehl,
418 2001; Pérez-Losada et al., 2005).

419 Quando o resultado obtido não está de acordo com o método analítico, uma causa
420 provável pode ser uma elevada atividade enzimática com consumo excessivo de substrato na
421 reação. Nestes casos, quando a absorvência final encontra-se no limite da capacidade dos testes é
422 recomendável realizar uma diluição da amostra e conseqüentemente, utilizar o fator de diluição
423 (FD) obtido para a correção do cálculo da atividade da enzima analisada (Infusino et al., 2010).

424 Neste estudo, foi demonstrado que a *Eisenia foetida* mantida nas condições de ensaio
425 estabelecidas apresentou substancial atividade das enzimas estudadas, indicando que os
426 resultados obtidos podem ser comparados aos achados na literatura para a acetilcolinesterase
427 (Caselli et al., 2006; Rault et al., 2007), aspartato aminotransferase (Scaps et al., 1997; Mosleh et
428 al., 2003), amilase (Prabha et al., 2007; Ueda et al., 2008), fosfatase alcalina (Park et al., 1996;
429 Park et al., 1998; Prabha et al., 2007) e glutathiona-S-transferase (Saint-Denis et al., 1998; Aly &
430 Schroder, 2008; Rizwan-ul-haq et al., 2012). Esse fato não é surpreendente, visto que, a *Eisenia*
431 *foetida* possui uma alta capacidade de decompor a matéria orgânica oriunda de resíduos agrícolas
432 (Loh et al., 2005; Antonioli et al., 2009) e industriais (Ravindran et al., 2008; Singh et al.,
433 2010), por intermédio das transformações bioquímicas promovidas por enzimas presentes em seu
434 trato digestório (Park et al., 1998; Prabha et al., 2007; Ueda et al., 2008).

435 Adicionalmente, relações entre as enzimas hidrolíticas, fosfatases, transaminases e
436 transferases provêm fortes evidências envolvendo as alterações bioquímicas encontradas em
437 minhocas e a contaminação do solo por pesticidas, as quais podem ser usadas como
438 bioindicadores (Mosleh et al., 2003; Rizwan-ul-haq et al., 2012; Velki & Hackenberger 2013).

439 Após a padronização deste ensaio para invertebrados (Monserrat et al., 2003), diversos
440 estudos foram conduzidos para avaliar as respostas oxidativas em populações de diferentes
441 ecossistemas expostas a poluentes (Geracitano et al., 2004; Pinho et al., 2005; Vargas et al.,
442 2010).

443 Embora o método FOX seja potencialmente útil em uma variedade de aplicações, seu uso
444 requer um controle cuidadoso das condições utilizadas (Bou et al., 2008). Na verdade, a
445 adaptação do ensaio FOX para os tecidos de invertebrados implica várias considerações
446 metodológicas, incluindo o tempo de absorção do complexo cromógeno, que deve ser
447 estabelecido para cada volume de amostra para determinar o tempo de incubação necessário para
448 a estabilização da leitura (Monserrat et al., 2003).

449 Os resultados observados na figura 2 estão de acordo com os dados encontrados na
450 literatura, no qual foi necessário um tempo de incubação entre 1 – 4 horas para estabilizar as

451 leituras pelo ensaio FOX para amostras de diferentes espécies animais, inclusive de
452 invertebrados (Hermes-Lima et al., 1995; Monserrat et al., 2003).

453 Produtos derivados da lipoperoxidação possuem um efeito dual (Niki, 2009). Desta forma
454 os níveis de hidroperóxidos podem refletir danos teciduais que um determinado organismo pode
455 sofrer, mas também podem indicar uma condição adaptativa, já que estas substâncias são
456 formadas quando há uma ativação das células de defesa (Dhainaut & Scaps, 2001; Cooper &
457 Roch, 2003).

458 O resultado observado na figura 3 pode ser explicado pelos experimentos que
459 demonstram a geração de formas reativas do metabolismo do oxigênio nas células celomáticas
460 de *E. foetida* como um mecanismo de resposta contra patógenos e agentes estressores ambientais
461 (Valembois & Lassègues, 1995; Xue et al., 2009; Zhang et al., 2009; Wu et al., 2011).

462 O branco da amostra dos extratos de *E. foetida* emitiu um pequeno sinal, equivalente a
463 8,4% da leitura (figura 4). Resultados similares foram obtidos para extratos de poliquetas
464 marinhas, em que branco da amostra representa 6,8% do valor total do conteúdo de
465 hidroperóxidos (Monserrat et al., 2003). Essas observações sustentam o fato de que a medida da
466 absorvância do branco da amostra é altamente recomendada devido a influência de interferentes
467 inespecíficos oriundos do tecido analisado (Monserrat et al., 2003; Bou et al., 2008).

468

469 **CONCLUSÕES**

470

471 Para a aplicação bem sucedida dos biomarcadores é de fundamental importância entender
472 suas propriedades intrínsecas, antes mesmo que o estudo de (eco) toxicidade seja projetado. O
473 estado do organismo teste e as fontes de variabilidade de biomarcadores devem ser conhecidos e
474 minimizados pela padronização tanto da cultura de manutenção como dos métodos analíticos
475 utilizados.

476 Através dos dados analisados foi verificado que as minhocas da espécie *Eisenia foetida*
477 mantidas em uma cultura padronizada apresentam atividade das enzimas estudadas e níveis de
478 hidroperóxidos e que os resultados são reproduzíveis sob as condições do ensaio.

479 Conforme os resultados obtidos, é possível constatar que a avaliação dos níveis de
480 hidroperóxidos lipídicos representa uma metodologia confiável para a determinação da LPO em
481 *Eisenia foetida*.

482 O uso de análises enzimáticas e do ensaio FOX neste organismo pelo sistema de
483 espectrofotometria semiautomática podem ser adequados para investigações toxicológicas ou de
484 adaptações metabólicas.

485

486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534

AGRADECIMENTOS

LITERATURA CITADA

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15537. **Ecotoxicologia Terrestre – ecotoxicidade aguda: método de ensaio com minhocas**. 11p, 2007.

ALY MA, SCHRODER P. 2008. Effect of herbicides on glutathione S-transferases in the earthworm, *Eisenia fetida*. **Environmental Science Pollution Research International** 15: 143–149.

ANTONIOLLI Z. I., STEFFEN G.P.K, STEFFEN R. B.. Utilização de casca de arroz e esterco bovino como substrato para a multiplicação de *Eisenia fetida* Savigny (1826). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 824-830, maio/jun., 2009

BORGERAAS J, NILSEN K, STRENSSEN J. Methods for purification of glutathione transferase in the earthworm genus *Eisenia* and their characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Pharmacol Toxicol Endocrinol** 114 (2) 129–140; 1996.

BOU R., CODONY R., TRES A., DECKER E. A., GUARDIOLA F. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation–xylenol orange method: A review of the factors that influence the method's performance. **Analytical Biochemistry** 377:1–15; 2008.

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

BUCKERFIELD, J. C. LEE K. E., DAVOREN C. W., HANNAY J. N. Earthworms as indicators of sustainable production in dryland cropping in southern Australia. **Soil Biology and Biochemistry** 29,(314) pp. W-554, 1997

CALZOLAI L, ANSORGE W, CALABRESE E, DENSLOW N, PART P, LETTIERI T (2007) Transcriptomics and proteomics. Applications to ecotoxicology. **Comp Biochem Physiol part D** 2:245–249

CAMPBELL M. K., FARRELL S. O. (2009). **Biochemistry, Sixth Edition**. Thomson Brooks/Cole. Canada, 838p.

CASELLI, F., GASTALDI, L., GAMBI, N., FABBRI, E. In vitro characterization of cholinesterases in the earthworm *Eisenia Andrei*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. C 143, 416–421.; 2006.

COOPER E L; ROCH P (2003). Earthworm immunity: a model of immune competence. **Pedobiologia** 47, 676–688.

- 535 DHAINAUT A; SCAPS P (2001). Immune defense and biological responses induced by toxics
536 in Annelida. **Canadian Journal of Zoology**. 79: 233–253.
537
- 538 ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES JR, V.V., FEATHERSTONE, R.M. A new and
539 rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**.
540 7, 88–95.; 1961.
541
- 542 FERNANDES J., AMORIM R., AZEVEDO I. MARTINS M.J. *In vitro* modulation of alkaline
543 phosphatase activity of *Saccharomyces cerevisiae* grown in low or high phosphate medium.
544 **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** (2008) 41: 41-46
545
- 546 FROVA C. 2006. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives.
547 **Biomolecular Engineering**. 23: 149–169.
548
- 549 GAMBI, N., PASTERIS, A., FABBRI, E. Acetylcholinesterase activity in the earthworm
550 *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. **Comparative Biochemistry and**
551 **Physiology**. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 145, 678–685.; 2007.
552
- 553 GAO Y., SUN Z., LIU Y., SUN X., LI Y., BAO Y., WANG G. WANG G. Effect of albendazole
554 anthelmintics on the enzyme activities of different tissue regions in *Eisenia fetida*. **European**
555 **Journal of Soil Biology** 43:S246-S251, 2007.
556
- 557 GAY C. A., GEBICKI J.M. Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological
558 systems by the ferric–xylenol orange method. **Analytical Biochemistry** 315 29–35; 2003.
559
- 560 GERACITANO L. A., R. BOCCHETTI, J.M. MONSERRAT, F. REGOLI, A. BIANCHINI.
561 Oxidative stress responses in two populations of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) after
562 acute and chronic exposure to copper. **Marine Environmental Research** 58 (2004) 1–17
563
- 564 GORRES, J.H., SAVIN, M.C., AMADOR, J.A. Soil micropore structure and carbon
565 mineralization in burrows and casts of an anecic earthworm (*Lumbricus terrestris*). **Soil Biology**
566 **and Biochemistry** 33, 1881–1887, 2001.
567
- 568 HABIG WH, PABST MJ, JAKOBY WB. Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in
569 mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry** 249(22):7130–7139; 1974.
570
- 571 HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation
572 in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. **Free Radical Biology &**
573 **Medicine**, 19: 271-280, 1995.
574
- 575 INFUSINO I, SCHUMANN G, CERIOTTI F, PANTEGHINI M. Standardization in
576 clinical enzymology: a challenge for the theory of metrological traceability. **Clinical Chemistry**
577 **and Laboratory Medicine**. 2010 Mar;48(3):301-7. doi: 10.1515/CCLM.2010.075.
578
- 579 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (1993). Soil quality-effects
580 of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*)—Part 1: determination of acute toxicity using soil
581 substrate. ISO 11268-1. Genève
582
- 583 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (2008) Soil quality -
584 avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour. Part 1—Test
585 with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). ISO 17512-1. Genève
586

- 587 JANSEN, R., G. SCHUMANN, H. BAADENHUIJSEN, P. FRANCK, C. FRANZINI, R.
588 KRUSE, A. KUYPERS, C. WEYKAMP, AND M. PANTEGHINI. 2006. Trueness verification
589 and traceability assessment results from commercial systems for measurement of six enzyme
590 activities in serum. An international study in the EC4 framework of the Calibration 2000 project.
591 **Clinica Chimica Acta** 368:160–167.
- 592
593 JEMEC A., DROBNE D., TIŠLER T., SEPČIĆ K. Biochemical biomarkers in environmental
594 studies—lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in
595 two crustacean species. **Environ Sci Pollut Res** (2010) 17:571–581
- 596
597 JIANG Z-Y, WOOLLARD ACS, WOLFF SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation
598 of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange—Comparison with the TBA assay and an iodometric
599 method. **Lipids** 26:853–856; 1991.
- 600
601 KOZLENKOV A., MANES T., HOYLAERTS M. F., MILLAN J. L. Function Assignment to
602 Conserved Residues in Mammalian Alkaline Phosphatases. **The Journal of Biological**
603 **Chemistry**. Vol. 277, No. 25, pp. 22992–22999, 2002
- 604
605 LACOURSE E J, HERNANDEZ-VADEL M, JEFFERIES J R, SVENDSEN C, SPURGEON D
606 J., BARRETT J., MORGAN A J, KILLE P, BROPHY P M. Glutathione transferase (GST) as a
607 candidate molecular-based biomarker for soil toxin exposure in the earthworm *Lumbricus*
608 *rubellus*. **Environmental Pollution** 157 2459–2469; 2009
- 609
610 LANNUTTI, F., MARRONE A., NAZZARENO RE. Binding of GSH conjugates to π -GST: A
611 cross-docking approach. **Journal of Molecular Graphics and Modelling** 32 (2012) 9-18.
- 612
613 LOH T.C., LEE Y.C., LIANG J.B., TAN D. Vermicomposting of cattle and goat manures by
614 *Eisenia foetida* and their growth and reproduction performance. **Bioresource Technology** 96:
615 11–114; 2005.
- 616
617 LOWE C. N, BUTT N. R.. Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic
618 ecotoxicological studies: A critical review. **European Journal of Soil Biology** 43: S281-S288;
619 2007.
- 620
621 MCELROY, T.C., DIEHL, W.J., 2001. Heterosis in two closely related species of earthworm
622 (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). **Heredity** 87, 598–608.
- 623
624 MONSERRAT, J M.; GERATACIANO, L A.; PINHO, G L. L. Determination of lipid peroxides
625 in invertebrates tissues using the Fe(III) xylenol orange complex formation. **Archives of**
626 **Environmental Contamination and Toxicology**. New York, v. 45, n. 2, p.177-183, aug., 2003.
- 627
628 MOSLEH YY, ISMAIL SM, AHMED MT, AHMED YM. Comparative toxicity and
629 biochemical responses of certain pesticides to the mature earthworm *Aporrectodea caliginosa*
630 under laboratory conditions. **Environmental Toxicology**. 2003 Oct;18(5):338-46.
- 631
632 NIKI E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical**
633 **Biology & Medicine** 47 (2009) 469–484
- 634
635 NUNES M. E. T., ESPÍNDOLA E. L. G. (2012) Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida,
636 Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial
637 substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology** DOI 10.1007/s10646-012-
638 0859-6

- 639
640 ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (1984).
641 Guideline for testing of chemicals n. 207—Earthworm acute toxicity test. Paris
642
- 643 ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (2004)
644 Guideline for testing of chemicals n. 222—Earthworm reproduction test. Paris
645
- 646 PARK H. W.; KOH K. S., PARK S.C. (1998) Molecular weights and inhibitor sensitivities of
647 alkaline phosphatase isoenzymes from the midgut of the earthworm, *Eisenia andrei*. **Soil**
648 **Biology and Biochemistry**. V30, n6: 831-832.
649
- 650 PARK S. C.; PARK H. W.; SMITH T. J. (1996) Expression of alkaline phosphatases during
651 embryonic development and immature stages of the earthworm, *Eisenia Andrei*. **Soil Biology**
652 **and Biochemistry**. V28, n4-5: 579-582.
653
- 654 PÉREZ-LOSADA, M., EIROA, J., MATO, S., DOMÍNGUEZ, J. 2005. Phylogenetic species
655 delimitation of the earthworms *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché, 1972
656 (Oligochaeta, Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA genes. **Pedobiologia** 49,
657 317–324.
658
- 659 PINHO G.L.L., MOURA DA ROSA, MACIEL F.E., BIANCHINI A, YUNESC J.S., L.A.O.
660 PROENC, MONSERRAT J.M. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin
661 exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. **Ecotoxicology and Environmental**
662 **Safety** 61 (2005) 353–360
663
- 664 PRABHA, L M; JAYARAAJ I A; JEYARAAJ R; SRINIVASA R. Comparative studies on the
665 digestive enzymes in the gut of earthworms, *Eudrilus eugenia* and *Eisenia foetida*. **Indian**
666 **Journal of Biotechnology**. 6:567-569; 2007.
667
- 668 PRAT, P., CHARRIER, M., DELEPORTE, S., FRENOT, Y., 2002. Digestive carbohydrases in
669 two epigenic earthworm species of the Kerguelen Islands (Subantarctic). **Pedobiologia** 46, 417–
670 427.
671
- 672 RAO, J.V., PAVAN, Y.S., MADHAVENDRA, S.S. Toxic effects of chlorpyrifos on
673 morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, *Eisenia foetida*. **Ecotoxicology**
674 **and Environmental Safety**. 54, 296–301.; 2003.
675
- 676 RAULT M, MAZZIA C, CAPOWIEZ Y. Tissue distribution and characterization of
677 cholinesterase activity in six earthworm species. **Comparative Biochemistry and Physiology**,
678 Part B 147:340–346; 2007.
679
- 680 RAVINDRAN B., DINESH S.L., KENNEDY L. J., SEKARAN G. (2008). Vermicomposting of
681 Solid Waste Generated from Leather Industries Using Epigeic Earthworm *Eisenia foetida*.
682 **Applied Biochem Biotechnol**; 151:480–488.
683
- 684 REINECKE, S.A., REINECKE, A.J. Biomarker response and biomass change of earthworms
685 exposed to chlorpyrifos in microcosms. **Ecotoxicology and environmental Safety**. 66, 92–101.;
686 2007.
687
- 688 RIZWAN-UL-HAQ M., ZHENLING Z., YONGXUE S., WENGUANG X. (2012). Evaluation
689 of glutathione s-transferase as toxicity indicator for roxarsone and arsanilic acid in *Eisenia*
690 *fetida*. **Journal of Applied Toxicology** 32: 731–738.

- 691
692 RODRIGUEZ-CASTELLANOS, L.; SANCHEZ-HERNANDEZ J. C. Earthworm biomarkers of
693 pesticide contamination: Current status and perspectives. **Journal of Pesticide Science**. 32(4),
694 360–371, 2007.
- 695
696 SAINT-DENIS M, LABROT F, NARBONNE JF, RIBERA D. Glutathione, glutathione related
697 enzymes and catalase activities in the earthworms *Eisenia fetida andrei*. **Archives of**
698 **Environmental Contamination and Toxicology** 35, 602–614; 1998.
- 699
700 SCAPS P, GRELLE C, DESCAMPS M. Cadmium and Lead Accumulation in the Earthworm
701 *Eisenia fetida* (Savigny) and its Impact on Cholinesterase and Metabolic Pathway Enzyme
702 Activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 116C, No. 3, pp. 233–238, 1997
- 703
704 SCHUMANN G, BONORA R, CERIOTTI F, FÉRARD G, FERRERO CA, FRANCK PF, et al.
705 **IFCC** primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of
706 enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory
707 Medicine. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine
708 aminotransferase. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. **Clin**
709 **Chem Lab Med**. 2002 Jul;40(7):718-24.
- 710
711 SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. W.; DOWD, C. A. (2001) Structure, function and
712 evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members
713 of an ancient enzyme superfamily. **The Biochemical Journal**. 360: 1 – 16
- 714
715 SINGH J., KAUR A., VIG A.P., RUP, P.J. (2010). Role of *Eisenia fetida* in rapid recycling of
716 nutrients from biosludge of beverage industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 73:
717 430–435
- 718
719 TIETZ NW, RINKER AD, SHAW LM. IFCC methods for the measurement of catalytic
720 concentration of enzymes Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase (orthophosphoric-
721 monoester phosphohydrolase, alkaline optimum, EC 3.1.3.1). **J Clin Chem Clin**
722 **Biochem**. 1983 Nov;21(11):731-48.
- 723
724 UEDA M., ASANO T., NAKAZAWA M., MIYATAKE K., INOUE K. Purification and
725 characterization of novel raw-starch-digesting and cold-adapted α -amylases from *Eisenia*
726 *foetida*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 150 (2008) 125–130
- 727
728 VALEMBOIS P, LASSÈGUES M (1995). In vitro generation of reactive oxygen species by free
729 coelomic cells of the annelid *Eisenia fetida andrei*: an analysis by chemiluminescence and nitro
730 blue tetrazolium reduction. **Developmental Comparative and Immunology**. 19(3):195-204.
- 731
732 VARGAS M. A., GEISH M. A., MACIEL F. E., CRUZ B. P., FILGUEIRA D. M. V. B.,
733 FERREIRA G. J., NERY L. E. M., ALLODI S. Influence of the dark/light rhythm on the effects
734 of UV radiation in the eyestalk of the crab *Neohelice granulata*. **Comparative Biochemistry**
735 **and Physiology**, Part C 151 (2010) 343–350
- 736
737 VELKI M., HACKENBERGER B. K. (2013). Biomarker responses in earthworm *Eisenia*
738 *andrei* exposed to pirimiphos-methyl and deltamethrin using different toxicity tests.
739 **Chemosphere** 90: 1216–1226
- 740
741 WENK M. R.; FERNANDIS A. Z. **Manuals in Biomedical Research — Vol. 3 A Manual for**
742 **Biochemistry Protocols**. 2007 by World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.

- 743
744 WHALEN J K; PARMELEE R W; SUBLER S (2000). Quantification of nitrogen excretion
745 rates for three lumbricid earthworms using ¹⁵N. **Biology and Fertility of Soils** 32:347–352
746
- 747 WINN-DEEN ES, DAVID H, SIGLER G, CHAVEZ R. Development of a direct assay for
748 alpha-amylase. **Clinical Chemistry**. 1988 Oct;34(10):2005-8.
749
- 750 WU S, WU E, QIU L, ZHONG W, CHEN J. Effects of phenanthrene on the mortality, growth,
751 and anti-oxidant system of earthworms (*Eisenia fetida*) under laboratory conditions.
752 **Chemosphere**. 2011 Apr;83(4):429-34.
753
- 754 XUE Y, GU X, WANG X, SUN C, XU X, SUN J, ZHANG B (2009). The hydroxyl radical
755 generation and oxidative stress for the earthworm *Eisenia fetida* exposed to tetrabromobisphenol
756 A. **Ecotoxicology**. Aug;18(6):693-9.
757
- 758 YASMIN S; D'SOUZA D. Effect of Pesticides on the Reproductive Output of *Eisenia fetida*.
759 **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 79:529–532; 2007.
760
- 761 ZHANG X, LU L, SHI Y; CHEN C; YANG Z; LI Y; FENG (2009). Antioxidant and metabolic
762 responses induced by cadmium and pyrene in the earthworm *Eisenia fetida* in two different
763 systems: contact and soil tests. **Chemistry and Ecology**, 25/3: 205–215

6. ARTIGO 2

EFFECTS OF IVERMECTIN ON OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS AND ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN THE EARTHWORM *EISENIA FETIDA* (ANNELIDA, OLIGOCHAETA)

Efeitos da ivermectina sobre biomarcadores do estresse oxidativo e atividade da
acetilcolinesterase em minhocas *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta)

Sandro Moreira Tuerlinckx¹

Tânia Beatriz Gamboa Araújo Morselli²

Ana Cláudia Kalil Huber³

ABSTRACT

The sub-lethal effects of ivermectin, a widely used veterinary endectocide was investigated under laboratory conditions using the epigeic earthworm *Eisenia fetida* as the test organism. A set of biochemical biomarkers, namely, acetylcholinesterase (AChE) as anticholinergic enzyme, glutathione- s-transferase (GST) as one detoxification enzyme, catalase (CAT) as one antioxidant enzyme and hydroperoxides levels (LPO), was selected to evaluate the responses of the earthworms in a period up to four weeks. The earthworms (n = 10, with three replicates) were exposed to the test substrates contaminated with ivermectin 0, 1, 5, 10, 50 and 100 mg kg⁻¹. Significant differences were tested using analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test. Furthermore, regression models were applied to check a dose-response effect. In this study, there was no earthworm mortality. Likewise no significant differences were

observed in AChE and CAT activities any of the ivermectin (IVM) treatments throughout the 28 days of exposure. However, a hormetic response was recorded on relative activity of these enzymes. In addition, the results show decreased values of the GST enzyme activity and increased levels of LPO in response to the higher concentrations of IVM at 7 days of treatment. On the other hand, after 28 days GST activity was still significantly increased ($p < 0.01$) in the exposure to 50mg kg^{-1} and 100mg kg^{-1} IVM. Therefore, it could be concluded that acute exposure of IVM induced oxidative stress and cause cellular lipid peroxidation in earthworms.

Index terms: endectocide, enzymatic markers, lipid peroxidation, toxicity.

RESUMO:

Os efeitos subletais da ivermectina (IVM), um endectocida veterinário amplamente utilizado, foram investigados sob condições de laboratório, utilizando a minhoca epigeica *Eisenia foetida* como organismo teste. Um conjunto de marcadores bioquímicos, ou seja, acetilcolinesterase (AChE), como enzima anticolinérgica, a glutationa-s-transferase (GST) como uma enzima de desintoxicação, a catalase (CAT), como uma enzima antioxidante e os níveis de hidroperóxidos (LPO), foi selecionado para avaliar as respostas das minhocas em um período de até quatro semanas. As minhocas ($n = 10$ e com três repetições) foram expostas aos substratos teste contaminados com ivermectina a 0, 1, 5, 10, 50 e 100 mg kg^{-1} . Diferenças significativas foram testadas utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguidas pelo teste de Duncan. Além disso, foram aplicados modelos de regressão para verificar um efeito dose-resposta. Neste estudo, não houve mortalidade de minhocas. Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas nas atividades da AChE e CAT em qualquer um dos tratamentos com IVM ao longo dos 28 dias de exposição. No entanto, uma resposta hormética foi registada em relação a atividade destas enzimas. Além disso, os resultados mostram valores diminuídos da atividade

enzimática da GST e aumento dos níveis de peroxidação lipídica, em resposta às concentrações mais elevadas de IVM no sétimo dia exposição. Por outro lado, depois de 28 dias a atividade da GST foi significativamente aumentada ($p < 0,01$) nas exposições a 50 mg kg^{-1} e 100 mg kg^{-1} de IVM. Portanto, pode-se concluir que a exposição aguda à IVM induz estresse oxidativo e ocasiona lipoperoxidação em minhocas.

Termos para indexação: endectocida, marcadores enzimáticos, lipoperoxidação, toxicidade.

INTRODUCTION

The control of ruminant gastrointestinal nematodes and ectoparasites, one of the major production health problems, are heavily reliant on the systematic and sometimes abusive use of anthelmintic drugs (Suarez, 2002; Floate et al., 2005). Macrocyclic lactones, or endectocides, are veterinary parasiticides that include the avermectins (abamectin, doramectin, eprinomectin, and ivermectin) and the milbemycins (moxidectin). Both chemical groups are produced through fermentation by soil dwelling actinomycetes from the genus *Streptomyces* and have similar biological activities (Shoop et al., 1995).

Ivermectin (22,23-dihydroavermectin B1) have achieved global popularity, for they have a broad spectrum of activity against nematodes and arthropods, are convenient to use, and generally have low mammalian toxicity (Floate et al., 2005; Lumaret et al., 2012). Its prolonged plasma concentrations and lipophilic characteristic ensure its pharmacological efficacy (Alveniere et al., 1999; Lifschitz et al., 2004). However, the drug's active metabolites eliminated in faeces in high concentrations (Halley et al., 1989; Lumaret et al., 2012) produce changes in the naturally colonising invertebrate fauna taking part in faecal degradation (Iglesias et al., 2006).

The occurrence of pharmaceuticals in the environment is a growing concern (Carlsson et al., 2006). In fact, ivermectin can reach the environment as an unchanged parent compound or a metabolite (Horvat et al., 2012).

According to Shoop et al. (1995), endectocide drugs are slightly to moderately metabolized; following treatment, a significant portion of the ivermectin parent compound (about 45%) is excreted mainly in feces (Halley et al., 1989) and is relatively persistent in dung, manure and soil with a reported half-life of 7 days to several months (Krogh et al., 2009; Horvat et al., 2012).

The parasiticide ivermectin is probably the veterinary pharmaceutical most frequently studied in ecotoxicology, often selected because of its persistence, toxicity and wide distribution (Römbke et al., 2010; Förster et al., 2011; Jensen & Scott-Fordsmand, 2012).

Ivermectin is an agonist of γ -aminobutyric acid (GABA) receptors and of glutamate-gated Cl⁻ channels, the later restricted to invertebrates (Shoop et al., 1995; Lumaret et al., 2012). Barna et al. (2001) and Csoknya et al. (2005) have demonstrated the presence of GABA receptors in the body wall and alimentary tract of the annelid *E. fetida*.

Toxic effects of macrocyclic lactones on earthworms have been demonstrated in other studies, confirming their potential risk to soil invertebrates (Sun et al., 2005; Diao et al., 2007; Kolar et al., 2008, Wang et al., 2012). However, the findings of ivermectin effects on earthworms have been controversial (Halley et al., 1989; Svendsen et al., 2003; Kaneda et al., 2006). These contradictory results underline the importance of additional investigation on endectocide effect in this organisms (Lumaret et al., 2012).

Earthworms are common soil organisms in most environments, and play an important role in improving structure and fertility of soils (Gorres et al., 2001). Therefore, the assessment of pollution impact in soil ecosystems has become a priority and interest has grown concerning the use of invertebrates as sentinel organisms (Bartlett et al., 2010).

Eisenia fetida, because of its low cost, easy handling and the standardization of the acute and subchronic ecotoxicological tests, is considered as a suitable biomonitor model species to determine the ecological hazard of chemicals contaminated soil (OECD, 1984; ISO 1998). However, a complementary approach to standard toxicity tests (mortality and reproduction rates) that can provide more information about the organism's stress response to individual toxicants and mixtures is the use of molecular or biochemical biomarkers (Gastaldi et al., 2007)

It has been reported that the activity of acetylcholinesterase (AChE, EC3.1.1.7), responsible for removing acetylcholine from synaptic clefts, can be a reliable parameter in evaluating the toxicity of heavy metals, pesticides and pharmaceuticals in earthworms (Rao et al., 2003; Gambi et al., 2007; Luo et al., 2009).

Detoxification enzymes are used widely to detect toxicity in soil and marine environments. Among these enzymes, glutathione-s-transferase (GST) have evolved for cellular protection against a range of xenobiotics and oxidative metabolic byproducts (Sheehan et al., 2001). Glutathione transferases are known to respond in earthworms after soil toxin exposure, suggesting GST as a candidate molecular pollution biomarker (La Course et al., 2009). GST studies in earthworm have depicted activity alterations after exposure to industrial metals, antibiotics and pesticide-contaminated soils (Maity et al., 2008; Aly & Schroder, 2008; Lin et al., 2012; Rizwan-ul-Haq et al., 2012).

Biochemical responses of earthworms, especially antioxidant responses, are sensitive to many soil contaminants, and can be regarded as early warning indicative biomarkers (Lin et al., 2010; Xie et al., 2011)

Catalase (CAT) is an antioxidant enzyme that converts hydrogen peroxide (H_2O_2) to oxygen and water. This enzyme plays a key role in the cellular antioxidant mechanism and is a widely used biomarker of oxidative stress (Saint-Denis et al., 1998; Nie et al., 2013). The study of antioxidant enzymes in *E. fetida* indicates that this organism has a good ability of dealing with

oxidants (Xue et al. 2009; Xie et al., 2011, Yang et al., 2012). Both GST and CAT are directly or indirectly involved in the biotransformation process in earthworms (Saint-Denis et al., 1998).

Reactive oxygen species (ROS) are subproducts of the oxidative metabolism known to initiate chain reactions with polyunsaturated fatty acids that generate lipid peroxides (Gutteridge, 1995). Several toxic compounds are known to exert its toxicity through oxidative stress generation augmenting lipid peroxides (LPO) levels, including metals, pesticides and pharmaceuticals (Xie et al., 2011; Lin et al., 2012; Nie et al., 2013). Furthermore, increased lipid peroxidation (LPO) is one of the major contributors to the loss of cell function on oxidative stress situation (Hermes-Lima et al., 1995). Thus, LPO determination has also been successfully employed to indicate oxidative stress induced on invertebrates animals by organic contaminants (Monserrat et al., 2003; Dorval et al., 2005)

Gastaldi et al. (2007) demonstrated that by measuring battery of biomarkers in earthworm *E. andrei* it is possible to reveal the changes in the physiological status of the organism in response to sublethal concentrations of inorganic and organic model contaminants.

Although the effects of ivermectin have been investigated in several invertebrate and vertebrate species, there is no data about its effects on earthworms biochemistry. Therefore, the aim of this study was to investigate and evaluate the sublethal effects of ivermectin, particularly on a set of biochemical biomarkers (AChE, GST, CAT and LPO) in *E. fetida*.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

For all tests, ivermectin (> 98% ivermectin), 5,5' dithiobis-2 nitrobenzoic acid (DTNB), acetylthiocholine iodide (AcSChI), 1-chloro-2,4- dinitrobenzene (CDNB), reduced glutathione

(GSH), xylenol orange (XO), cumene hydroperoxide (CHP) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the study were of analytical grade.

Test organism and experimental procedures

Eisenia fetida were obtained from Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) Pelotas, RS, Brazil and were kept and maintained in the Laboratory of Animal Biochemistry and Toxicology at the Centro de Ciências Rurais, URCAMP Bagé, RS, Brazil, in a mixture of coconut powder and dry cattle manure (50:50 v/v) in sturdy plastic containers with a capacity of 1000 g of dry substrate, according to Nunes & Espíndola (2012).

The culture was maintained at $21 \pm 2^{\circ}$ C and under a 12 h light/12 h dark cycle and light intensity of 600–800 lux. Forty-eight hours before the tests, the organisms were acclimatized to the test substrate (control substrate, without test chemical).

The earthworms used in this assay were all adults weighing 300–400 mg and had a well developed clitellum. According to Gao et al. (2007), pre-treated urine and pollution-free cattle manure was used as test substrate in this study. The IVM, purchased from Sigma with a purity above 98%, was first dissolved in acetone then mixed into the substrate with treatment rates at 0, 1, 5, 10, 50 and 100mg kg^{-1} dry weight. Distilled water was added to the mixture to reach a 75% weight increase. The substrates (pH 7.0 and C/N: 24) after being treated with IVM were transferred to plastic containers (14 cm diameter, 10 cm depth), which were placed in ventilated case to allow residual acetone to evaporate overnight. Water was added to compensate for the lost weight due to acetone evaporation, then earthworms were introduced.

A total of 10 individually weighed earthworms (329 ± 2 mg; served as 10 replicates) were placed into each container. The containers were maintained in an environmental chamber under $21 \pm 2^{\circ}$ C and a lighting of about 800 lux with a 12/12-h photo-period; water was supplemented to ensure appropriate water content of the substrate by weighing the containers.

The mortality was determined at 7, 14 and 28 days. Earthworms were sorted by hands and considered to be dead if they did not respond to gentle mechanical stimuli to the anterior region (Xiao et al., 2006). In addition, at days 7, 14 and 28 of exposure, earthworms of four replicates per treatment were removed from the substrate, washed in distilled water and dried on filter paper before biochemical biomarkers assays.

Sample preparation and enzyme measurement

The earthworms were kept on damp filter paper for 24 h (in the dark at 21 ± 20 C) to void the gut contents, weighed individually and snap-frozen in liquid nitrogen prior to enzyme assays. Individual earthworms from each replicate were defrosted on ice and homogenized in four parts (w:v) of Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 7.5) containing 1mM PMSF using a Heidolph homogenizer. The homogenate was then centrifuged at 3000g for 15 minutes and 4° C to yield the supernatant fraction, which was frozen in liquid nitrogen and stored at -20° C until analysis.

Total protein content in the homogenate was determined using a commercial kit (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil), employing Biuret's reagent. Determinations were carried out in triplicate at 545 nm.

Relative activity for all enzymatic stimulations is expressed as follows:

$$\text{Relative enzyme activity} = \frac{V_n - V_o}{V_o} \times 100$$

where V_o is enzyme activity in the absence of ivermectin and V_n is enzyme activity in its presence.

Measurement of ACHE activity

Supernatants were defrosted on ice and the cholinesterase activity was determined using the method described by Ellman et al. (1961) adapted for use in earthworms. For this test acetylthiocholine iodide is used as substrate and 5,5' dithio-bis 2 nitrobenzoic acid (DTNB) as chromogen. The acetylthiocholine iodide is hydrolyzed by cholinesterase. This reaction releases thiocholine, which reacts with DTNB to produce a yellow anion that can be detected spectrophotometrically at 412 nm. The activity rate was measured kinetically using a semiautomatic biochemical analyzer (*TP Analyzer*). The samples (50 μL) were mixed with 0,1 mol L^{-1} , pH 7,0 phosphate buffer (1000 μL), 50 μL de DTNB (0,01mol L^{-1}) and reaction initiated by addition of 50 μL acetylthiocholine iodide (0,01mol L^{-1}) at 25⁰ C. A blank, consisting of pH 7 phosphate buffer, was read before each run. An average of the three readings was taken for each sample. The enzymatic activity was expressed as nmol of acetylthiocholine hydrolyzed per min per mg of protein and for calculations the absorption coefficient of $13.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was used.

Measurement of CAT activity

Catalase activity was determined according to Saint-Denis et al. (1998) by measuring the rate of hydrogen peroxide reduction as a decrease in absorbance over time at 240 nm using a Femto 700S Plus spectrophotometer. To calculate H_2O_2 concentration, a millimolar extinction coefficient of 43.6 was used. Specific enzyme activity was calculated considering the total protein content in the homogenates. All results were expressed as enzyme units. One CAT unit represents the amount of enzyme needed to degrade 1 mmol of H_2O_2 per min and per mg of total proteins present in the homogenates at pH 8.00 and 25⁰ C.

Measurement of GST activity

The activity of GST was determined according to the method of Habig et al. (1974). The assay mixture contained 960 μL Tris-HCl buffer (0.1mol L^{-1} , pH 7), 10 μL CDNB (100mmol L^{-1}), 10 μL glutathione (GSH, 100mmol L^{-1}) and 20 μL of sample. Kinetics was recorded at 340 nm and the assay was carried out at 25°C using a semiautomatic biochemical analyzer (*TP Analyzer*). One GST unit is the enzyme amount necessary to conjugate 1 mmol of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (Sigma) generated per min per mg of protein and for calculations the absorption coefficient of $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Measurement of lipid hydroperoxides levels (FOX assay)

Whole individuals of *E. fetida* were homogenized (1:9) in cold methanol 100%. Samples were centrifuged at $1000 \times g$ (4°C) during 10 min and the supernatant stored (Hermes Lima et al., 1995). LPO was evaluated through the FOX-assay as described by Hermes-Lima et al. (1995) and adapted for invertebrate tissues by Monserrat et al. (2003). Lipid hydroperoxides were determined using FeSO_4 (0.25mM) prepared immediately prior to use, H_2SO_4 (0.25mM), and xylenol orange (1 mM). Sample absorbance was read (546 nm) after 100min of incubation at room temperature ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) using a semiautomatic biochemical analyzer (*TP Analyzer*). Sample absorbance was converted in nmol of cumene hydroperoxide (CHP) using a CHP standard curve. Lipid peroxides were quantified in terms of CHP equivalents per gram of wet weight tissue.

Statistical analysis

Parametric tests were preceded by Shapiro-Wilk for normal distribution and Levene test for homogeneity of variances. Differences in enzyme activity were tested for treatment significance using one-way analysis of variance (ANOVA). In addition, *post hoc* comparison

(Duncan test) was carried out to check for differences between the exposed and control groups. Differences between groups were considered significant at $P < 0.05$ or $P < 0.01$. Dose-response curves for relative activity of enzymes obtained after exposure to ivermectin were fitted with the polynomial function. All statistics were performed using IBM SPSS software (SPSS 20.0).

RESULTS AND DISCUSSION

Contradictory results are found with ivermectin toxicity tests in earthworms. Work conducted by Halley et al. (1989) for instance gives an LC_{50} value for the toxicity of ivermectin to *Eisenia foetida* of 314 mg kg^{-1} dry soil, while Gunn and Sadd (1994) observed no survival in contaminated soil already at a concentration of 16 mg kg^{-1} ; Sun et al. (2005) observed no survival at 24.1 mg kg^{-1} and Wang et al. (2012) at 68.11 mg kg^{-1} dry soil for the same substance. However, Svendsen et al. (2003) and Kaneda et al. (2006) showed that effects of ivermectin on earthworms are unlikely at field-relevant concentrations.

In this study, there was no earthworm mortality in any of the IVM treatments after 28 days of exposure (data not shown) in cattle manure used as test substrate. Because no mortality was observed in any of the treatments, the LC_{50} was determined to be $> 100 \text{ mg kg}^{-1}$ substrate (dry weight).

Since the effects of ivermectin on earthworms have been investigated, there is no other data about its effects on molecular biomarkers of *E. foetida*. The usage of molecular biomarkers is of great importance since biomarkers are able to reveal alterations, caused by pollutants, in the physiological status of organisms (Velki & Hackenberger, 2013).

Acetylcholinesterase is a key enzyme in the normal functioning of cholinergic synapses at the nervous system and neuromuscular junction. It hydrolyzes efficiently the neurotransmitter acetylcholine, and it is considered a biomarker to assess pesticide effects on various species of earthworms (Caselli et al., 2006; Rault et al., 2007).

Although ivermectin interacts stereoselectively and with high affinity to a glutamate-gated or GABA-sensitive chloride channels (SHOOP et al., 1995), research carried out by Alonso-Villalobos and Martinez-Grueiro (2000) show that IVM induces inhibitory effects on AChE secretion in adult stages of *Heligmosomoides polygyrus*.

Fig. 1 shows that activity of AChE in the earthworm *E. fetida* no depends of the IVM concentrations and duration of exposure. In the earthworm samples, no significant differences were observed throughout the 28 days of exposure.

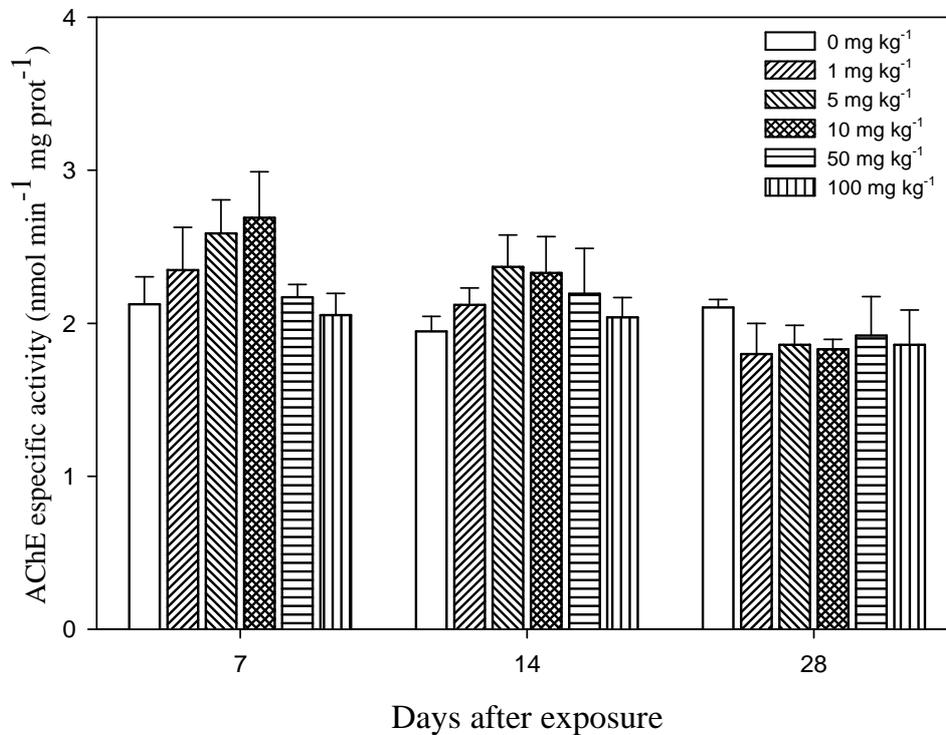


Figure 1. Acetylcholinesterase (AChE) activity of *Eisenia fetida* after 7, 14 and 28 days exposure to various concentrations of ivermectin (IVM). Results are expressed as means \pm standard deviations (n = 4).

However, the application of low doses of ivermectin using manure substrate test led to a increase in the relative activity of this enzyme, i.e. a hormetic response was recorded at 7 days of exposure (figure 2). The hormetic response is characterized by a low-dose stimulation and a

high-dose inhibition (Zhang et al., 2009; Velki & Hackenberger, 2013). The results showed that at a concentration of 10 mg kg⁻¹ the AChE activity increased to 26.62% and decreased 12,57% at 100 mg kg⁻¹ of the level of activity in the control.

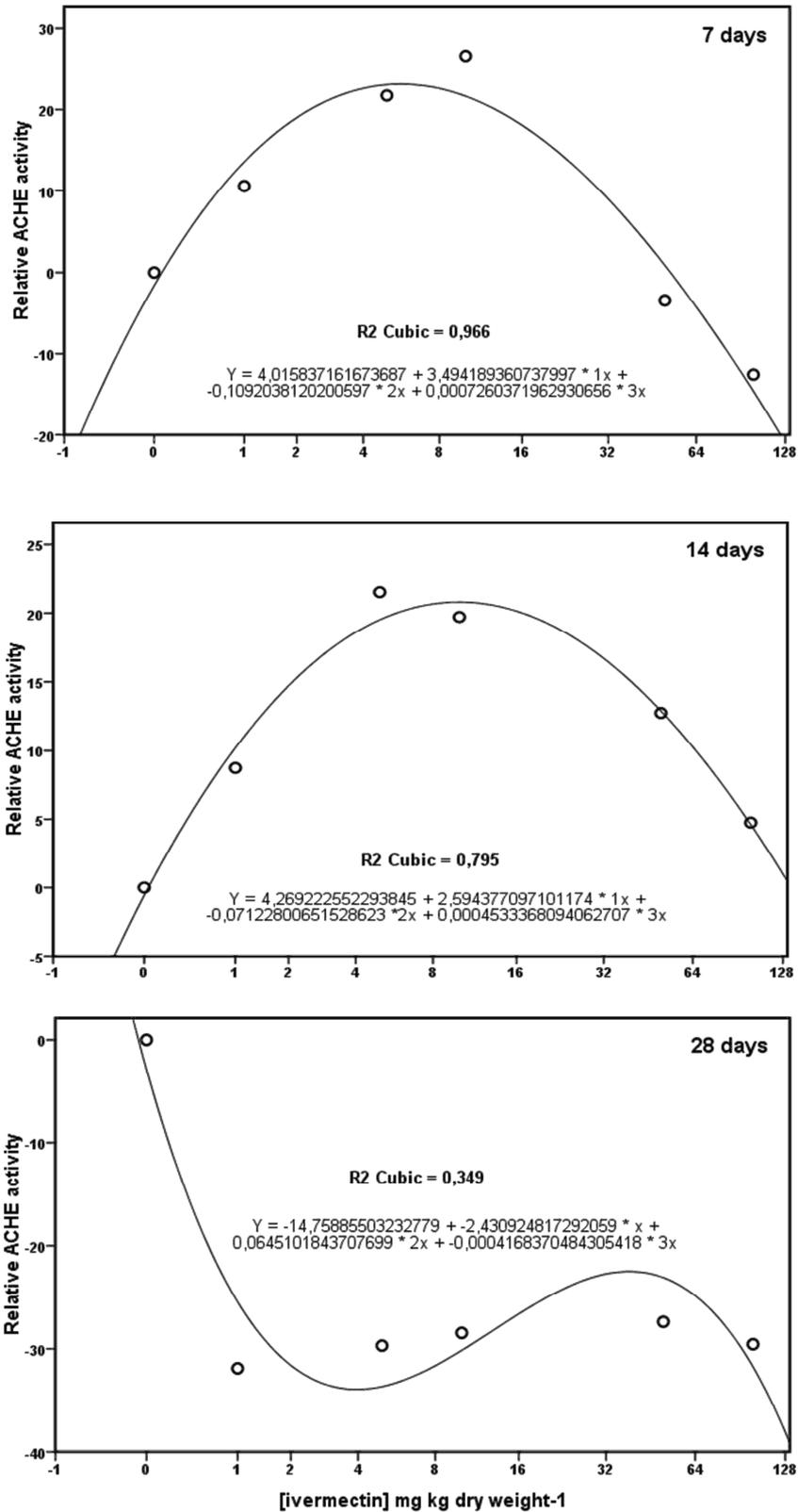


Figure 2. Dose–responses of relative acetylcholinesterase (AChE) activity compared to the control measured in *Eisenia fetida* exposed to IVM after 7, 14 and 28 days.

The hormetic effect on AChE activity in earthworms was documented after exposure of *E. fetida* earthworms to organophosphate temephos (Hackenberger et al., 2008), after exposure of *E. andrei* to formalin (Hackenberger et al., 2012) and to pirimiphos-methyl (Velki & Hackenberger, 2013). The phenomenon of hormesis is probably related to the activation of adaptive pathways that are responsible for cellular and physiological homeostasis (Zhang et al., 2009).

Oxidative stress can be induced by pesticides and pharmaceuticals, either by overproduction of free radicals or by alteration in antioxidant defense mechanisms, including detoxification and scavenging enzymes (Gao et al., 2007; Lin et al., 2012; Ma et al., 2012). Since oxidative stress has been reported to play an important role in the toxicity of various veterinary drugs (El-Shenawy 2010; Nie et al., 2013), in this study certain biomarkers of oxidative stress were measured.

The activity of CAT showed no significant alteration with exposure time and concentration of the ivermectin (figure 3). Differently, the relative activity exhibit a hormetic effect at 28 days of exposure (figure 4). The increase in the CAT activities, followed by a decrease after longer exposure, has been described in earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna* after exposure to pesticides (Schreck et al., 2008) and *E. andrei* exposed to pirimiphos-methyl (Velki and Hackenberger, 2013).

Figure 5 shows GST activity in the earthworm *E. foetida* exposed to increased concentrations of ivermectin at different days. There was significant inhibition ($p < 0.05$) of the GST activity after exposure to 10 mg kg^{-1} IVM in the earthworm at 7 days. The highest decrease ($p < 0.01$) in the GST activity was recorded seven days after exposure to the two highest

concentrations (50 mg kg^{-1} and 100 mg kg^{-1}) of ivermectin, whereas exposure for 14 and 28 days caused significant increased in the activity.

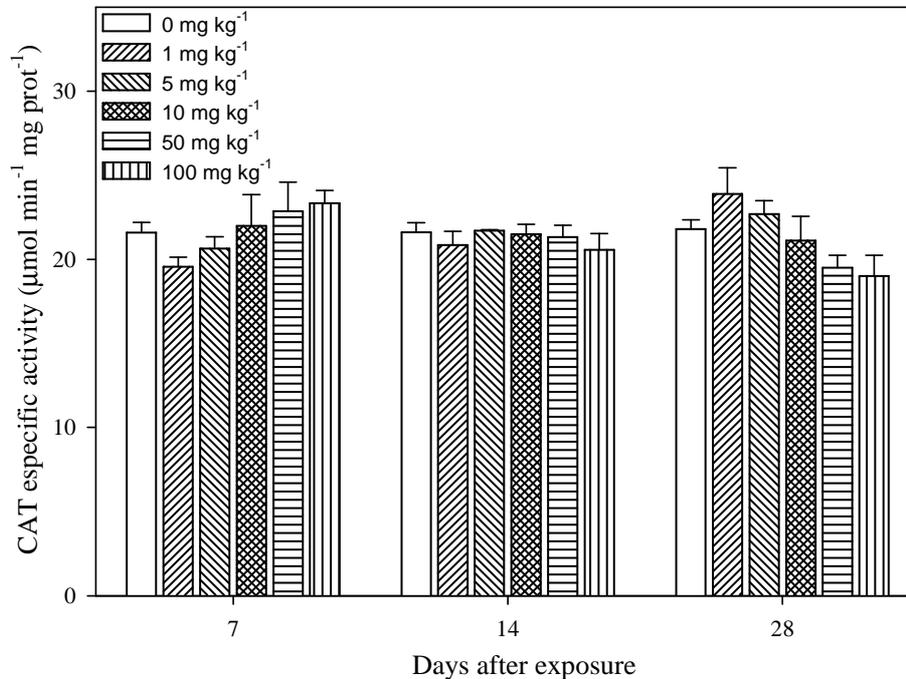


Figure 3. Catalase (CAT) activity of *Eisenia fetida* after 7, 14 and 28 days exposure to various concentrations of ivermectin (IVM). Results are expressed as means \pm standard deviations ($n = 4$).

Compared with that of the control, a significantly higher level in the activity of GST was observed when the concentration of IVM in substrate was equal to 50 mg kg^{-1} ($p < 0.01$) at 14 days, but no dose response pattern could be observed. After 28 days GST activity was still significantly increased ($p < 0.01$) in the exposure to 50 mg kg^{-1} and 100 mg kg^{-1} (figure 5).

The dose-response curve showed a significant decrease by 17%, 21% and 28%, respectively, seven days in exposures to 10 mg kg^{-1} , 50 mg kg^{-1} and 100 mg kg^{-1} IVM. Otherwise, the GST activity was significant increased by 25% and 32% after 28 days exposure to 50 mg kg^{-1} and 100 mg kg^{-1} IVM, respectively (figure 6). No hormetic effect was observed.

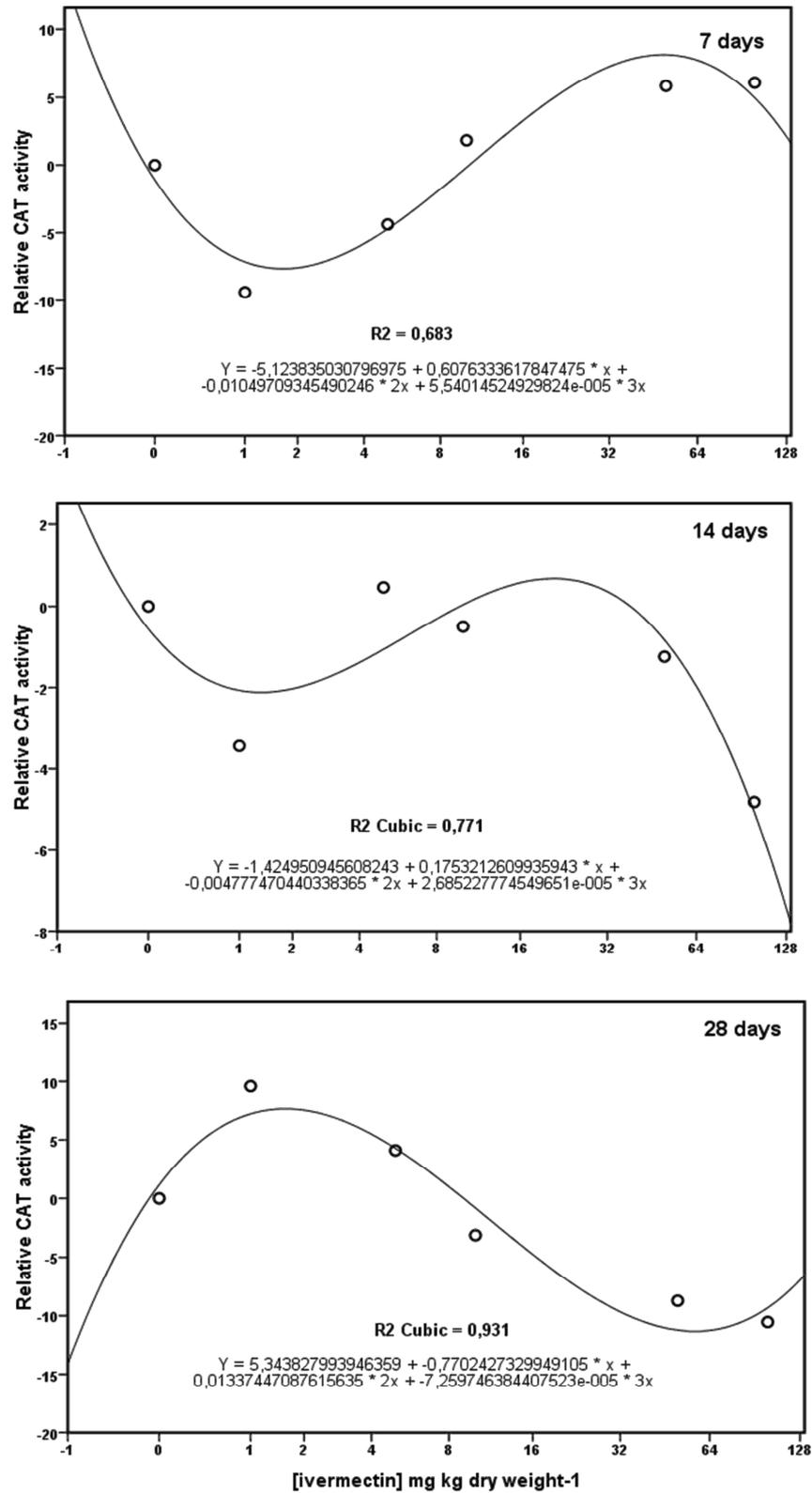


Figure 4. Dose–responses of relative catalase (CAT) activity compared to the control measured in *Eisenia fetida* exposed to IVM after 7, 14 and 28 days.

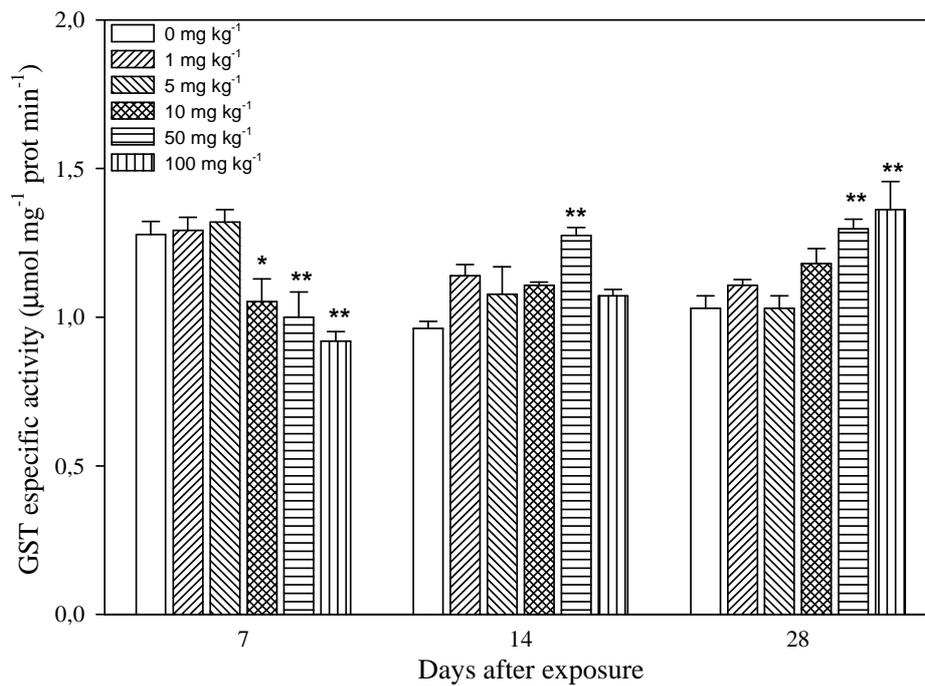


Figure 5. Glutathione - S - transferase (GST) activity of *Eisenia fetida* after 7, 14 and 28 days exposure to various concentrations of ivermectin (IVM). Results are expressed as means \pm standard deviations (n = 4). Means were compared by Duncan tests. Statistical significance vs. control group: *P < 0.05, **P < 0.01.

Particularly, the GST activity in the whole earthworm decreased at concentrations between 10 mg kg⁻¹ and 100 mg kg⁻¹, which accorded with the results of Kolar et al. (2010) who found a similar response of isopods at high abamectin concentrations tested (100 and 300 mg kg⁻¹ dry soil).

According to Sheehan et al. (2001), GST response might vary with species, organ and the type of toxicant. In fact, our results contradict those of Rizwan-ul-Haq et al. (2012), who observed increased values of the GST enzyme activity in response to the higher concentrations of roxarsone and arsanilic acid in the early days of treatment.

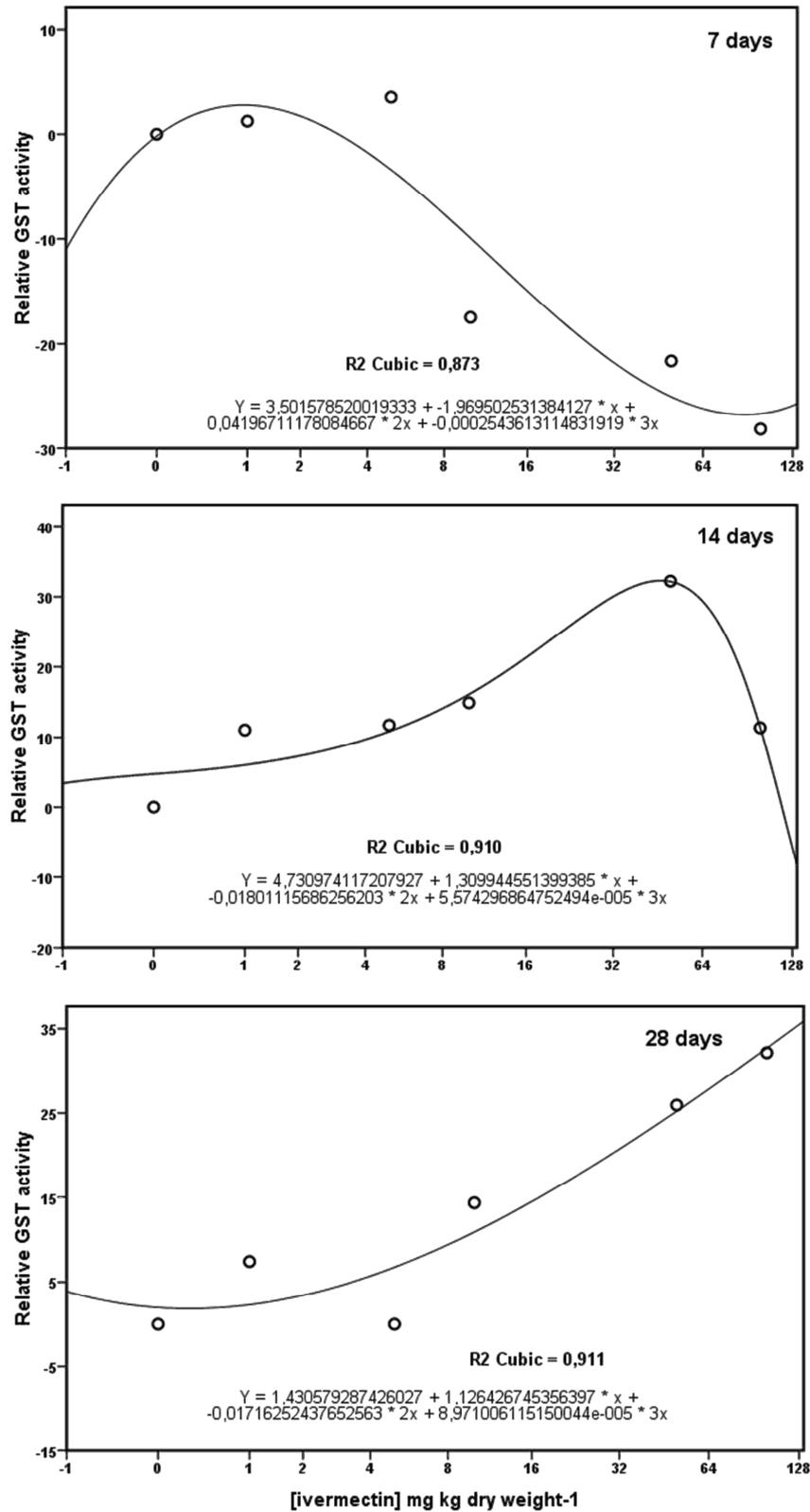


Figure 6. Dose-responses of relative glutathione - S - transferase (GST) activity compared to the control measured in *Eisenia fetida* exposed to IVM after 7, 14 and 28 days.

On the other hand, Gao et al. (2007) found that GST activity was inhibited significantly by albendazole in *E. fetida* after seven days of exposure and Lin et al. (2012) reported that chlortetracycline could stimulate the activity of GST in earthworms *E. fetida* at low concentrations while restraining the activity of GST at the high concentrations at 28 days of exposure.

The production of lipid peroxidation in organisms can indirectly reflect the degree of intracellular damage. It has been proven that FOX assay is sensitive enough to judge cellular oxidative injury on invertebrates (Montserrat et al. 2003)

Lipid peroxidation, assessed through the content of lipid hydroperoxides (FOX assay), was not affected at the lowest tested concentrations of IVM in comparison to the control, while lipid hydroperoxides enhanced significantly ($p < 0.05$) as the concentration of IVM increased compared to the control at the concentration of 50 mg kg^{-1} and 100 mg kg^{-1} after seven days exposure. (Figure 7).

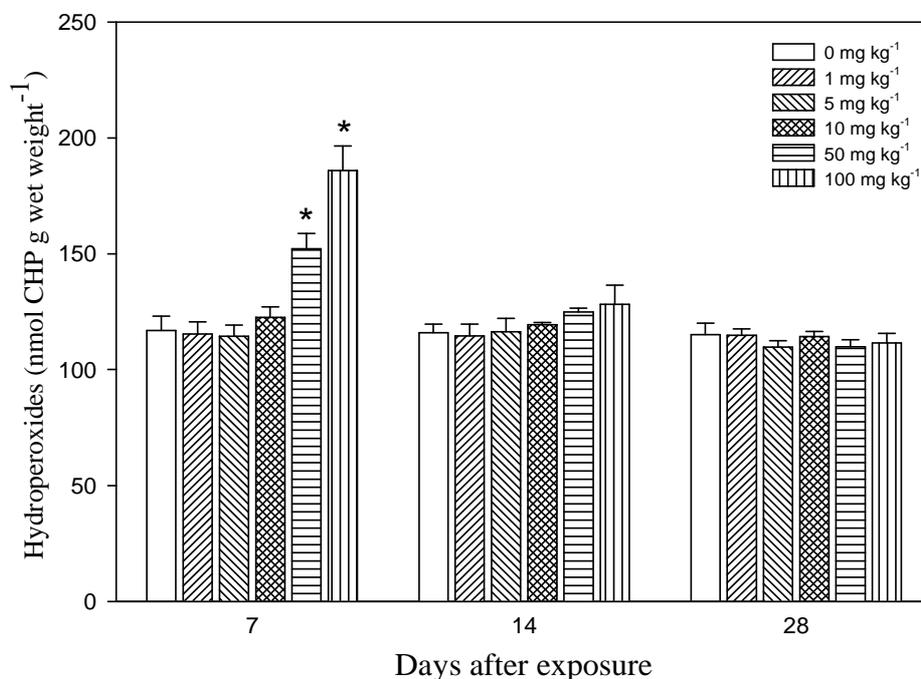


Figure 7. Lipid hydroperoxides levels of *Eisenia fetida* after 7, 14 and 28 days exposure to various concentrations of ivermectin (IVM). Results are expressed as means \pm standard

deviations (n = 4). Means were compared by Duncan tests. Statistical significance vs. control group: *P < 0.05, **P < 0.01.

Work done by El-Shenawy (2010) revealed that abamectin showed increased cellular lipid peroxidation (LPO) levels and induced decrease in GST activity of isolated rat hepatocytes.

As noted previously, antioxidant enzymes such as CAT and GST can protect organisms from oxidative damage by removing ROS. CAT reduces H₂O₂ to H₂O by catalysis, while GST is involved in the detoxification of xenobiotics and plays a pivotal role in defense against oxidative damage (Hermes-Lima et al., 1995; Monserrat et al., 2003). Changes in antioxidant enzyme activities and LPO levels can reflect the oxidative stress caused by ROS.

In the present study, the GST activity was inhibited at higher concentrations of IVM, while LPO levels were increased. These changes indicate that severe oxidative stress in earthworms was caused by higher levels of IVM at 7 days exposure. This finding is similar to results shown for tetrabromobisphenol A (Xue et al., 2009) and decabromodiphenyl ether (Xie et al., 2011). However, significant increases in GST activity occurred after 28 days. This observation is in accordance with Yang et al. (2012) who showed that the earthworms *E. fetida* exposed to cadmium-contaminated soil with long duration induced GST activity.

CONCLUSIONS

The concentrations of IVM used in our study were sub-lethals under the cited experimental conditions. The data presented in this study show that the endectocide IVM cause measurable changes in molecular biomarkers of earthworms *E. fetida*. However ivermectin has no effect on AChE and CAT activity. On the other hand, the relative activity of these enzymes exhibit a hormetic effect. The presence of hormesis induced by ivermectin in the earthworm may be related to activation of adaptive pathways.

Although not all differences in molecular biomarkers after exposure to ivermectin were significant, a toxic effect due to exposure at high concentrations was noticed. Our results clearly show decreased values of the GST enzyme activity and increased levels of LPO in response to the higher concentrations of IVM in the early days of treatment. Therefore, it could be likely concluded from the present study that acute exposure of IVM induced oxidative stress and cause cellular lipid peroxidation in earthworms. However, specific mechanisms of GST reduction and LPO induction by IVM in earthworms remain unclear and require further study.

A suite of biomarkers is helpful in the evaluation of the ivermectin toxicity on earthworms and could be instrumental in monitoring contaminated ecosystems with veterinary drugs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was sponsored by PROPPEX/URCAMP and PPG-SPAF/UFPel.

REFERENCES

ALONSO-VILLALOBOS P, MARTINEZ-GRUEIRO MM. The *in vitro* secretion of acetylcholinesterase by adult stages of *Heligmosomoides polygyrus*: the effects of broad-spectrum anthelmintics. **Journal of Veterinary and Medicine, B. Infect Dis Vet Public Health.** 47(1):1-8. 2000

ALVINERIE, M., SUTRA, J.F., GALTIER, P., LIFSCHITZ, A., VIRKEL, G., SALLOVITZ, J., LANUSSE, C. Persistence of ivermectin in plasma and faeces following administration of a sustained-release bolus to cattle. **Research in Veterinary Science.** 66:57–61, 1999.

ALY MA, SCHRODER P. Effect of herbicides on glutathione S-transferases in the earthworm, *Eisenia fetida*. **Environmental Science Pollution Research International** v. 15, p. 143–149, 2008.

BARNA J., CSOKNYA M., LAZAR ZS., BARTHO L., HAMORI J., ELEKES K. Distribution and action of some putative neurotransmitters in the stomatogastric nervous system of the earthworm, *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Annelida). **Journal of Neurocytology**, v. 30, p. 313–325, 2001.

- BARTLETT, M.D., BRIONES, M.J.I., NEILSON, R., SCHMIDT, O., SPURGEON, D., CREAMER, R.E. A critical review of current methods in earthworm ecology: from individuals to populations. **European Journal of Soil Biology**, v. 46, p. 67–73, 2010.
- CARLSSON, C., JOHANSSON A-K, ALVAN G., BERGMAN K., KÜHLER T. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. **Science of the Total Environment**, v. 364, p. 67–87, 2006.
- CASELLI, F., GASTALDI, L., GAMBI, N., FABBRI, E. In vitro characterization of cholinesterases in the earthworm *Eisenia Andrei*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. C 143, 416–421.; 2006.
- CSOKNYA M, TAKÁCS B., KOZA A., DÉNES V., WILHELM M., HIRIPI L., KASLIN J., ELEKES K. Neurochemical characterization of nervous elements innervating the body wall of earthworms (*Lumbricus*, *Eisenia*): immunohistochemical and pharmacological studies. **Cell and Tissue Research**, v. 321, p. 479–490, 2005.
- DIAO X, JENSEN J, HANSEN A D. Toxicity of the anthelmintic abamectin to four species of soil invertebrates. **Environmental Pollution** 148:514-519; 2007.
- DORVAL, J., LEBLOND, V., DEBLOIS, C., HONTELA, A. Oxidative stress and endocrine endpoints in white sucker (*Catostomus commersoni*) from a river impacted by agricultural chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry** 24, 1273–1280, 2005.
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES JR, V.V., FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. 7, 88–95.; 1961.
- EL-SHENAWY NS. Effects of insecticides fenitrothion, endosulfan and abamectin on antioxidant parameters of isolated rat hepatocytes. **Toxicology In Vitro**. 24(4):1148-57, 2010
- FLOATE, K, WARDHAUGH K, BOXALL A, SHERRATT T N. Fecal residues of veterinary parasiticides: Nontarget Effects in the Pasture Environment. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 153–79, 2005.
- FÖRSTER, B., BOXHALL, A., COORS, A., JENSEN, J., LIEBIG, M., POPE, L., MOSER, T., RÖMBKE, J. Fate and effects of ivermectin on soil invertebrates in terrestrial model ecosystems. **Ecotoxicology** v. 20, p. 234 – 245, 2011.
- GAMBI, N., PASTERIS, A., FABBRI, E. Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology**. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 145, 678–685.; 2007.
- GAO Y., SUN Z., LIU Y., SUN X., LI Y., BAO Y., WANG G. WANG G. Effect of albendazole anthelmintics on the enzyme activities of different tissue regions in *Eisenia fetida*. **European Journal of Soil Biology** 43:S246-S251, 2007.
- GASTALDI, L., RANZATO, E., CAPRI, F., HANKARD, P., PIRES, G., CANESI, L., VIARENGO, A., PONS, G. Application of a biomarker battery for the evaluation of the

sublethal effects of pollutants in the earthworm *Eisenia andrei*. **Comparative Biochemistry and Physiology. C** 146, 398–405, 2007.

GORRES, J.H., SAVIN, M.C., AMADOR, J.A. Soil micropore structure and carbon mineralization in burrows and casts of an anecic earthworm (*Lumbricus terrestris*). **Soil Biology and Biochemistry** 33, 1881–1887, 2001.

GUNN A, SADD JW. The effect of ivermectin on the survival, behaviour and cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*. **Pedobiologia** 38:327–333; 1994.

GUTTERIDGE J. M. C. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. **Clinical Chemistry**. 41/12, 1819-1 828. 1995

HABIG WH, PABST MJ, JAKOBY WB. Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry** 249(22):7130–7139; 1974.

HACKENBERGER B K, JARIC-PERKUSIC, STEPIC S. Effect of temephos on cholinesterase activity in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety** 71:583–589; 2008.

HACKENBERGER, B.K., VELKI, M., STEPIC, S., HACKENBERGER, D.K. The effect of formalin on acetylcholinesterase and catalase activities, and on the concentration of oximes, in the earthworm species *Eisenia andrei*. **European Journal of Soil Biology**, v. 50, p. 137–143, 2012.

HALLEY BA, JACOB TA, LU AYH. The environmental impact of the use of ivermectin: environmental effects and fate. **Chemosphere**, v. 18, p. 1543–1563, 1989.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. **Free Radical Biology and Medicine**, 19: 271-280, 1995.

HORVAT A.J.M., PETROVIC´ M., BABIC´ S., PAVLOVIC´ D.M., AS´PERGER D., PELKO S., MANCE A.D., KASTELAN-MACAN M. Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, 31: 61-84. 2012.

IGLESIAS, L.E., SAUMELL, C.A., FERNANDEZ, A.S., FUSE, L.A., LIFSCHITZ, A.L., RODRIGUEZ, E.M., STEFFAN, P.E., FIEL, C.A. Environmental impact of ivermectin excreted by cattle treated in autumn on dung fauna and degradation of faeces on pasture. **Parasitology Research**. 100, 93–102. 2006.

ISO. Soil Quality: Effects of Pollutants on Earthworms (*Eisenia fetida*). Part II. Method for the Determination of Effects on Reproduction. **International Standard Organization**, Geneva. Standard Number No. 11268-2. 1998.

JENSEN J., SCOTT-FORDSMAND, J. J. Ecotoxicity of the veterinary pharmaceutical ivermectin tested in a soil multi-species (SMS) system. **Environmental Pollution**, v. 171, p. 133 - 139, 2012.

- KANEDA, N., YAMASHITA, T., UCHIDA, S., SHIMANO, N., MIYOSHI, M., SASAKI, Y., ENAMI. Effects of ivermectin in dung pats on earthworm (Megascolecidae) populations and pat degradation in Japanese grassland. **Applied Soil Ecology** 31:280–285; 2006.
- KOLAR, L., JEMEC, A., VAN GESTEL, C.A.M., VALANT, J., HRZENJAK R., ERZEM NK., ZIDAR P. Toxicity of abamectin to the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). **Ecotoxicology**, v. 19, p. 917–927, 2010.
- KOLAR, L., KOZUH ERZEN, N., HOGERWERF, L., VANGESTEL, C.A.M. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. **Environmental Pollution**. V. 151, p. 182–189, 2008.
- KROGH, K.A., JENSEN, G.G., SCHNEIDER, M.K., FENNER, K., HALLING-SORENSEN, B. Analysis of the dissipation kinetics of ivermectin at different temperatures and in four different soils. **Chemosphere** 75, 1097–1104; 2009.
- LACOURSE E J, HERNANDEZ-VIADEL M, JEFFERIES J R, SVENDSEN C, SPURGEON D J., BARRETT J., MORGAN A J, KILLE P, BROPHY P M. Glutathione transferase (GST) as a candidate molecular-based biomarker for soil toxin exposure in the earthworm *Lumbricus rubellus*. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 2459–2469; 2009.
- LIFSCHITZ A., SALLOVITZ J., IMPERIALE F., PIS A., LORDA J. J., LANUSSE C. Pharmacokinetic evaluation of four ivermectin generic formulations in calves. **Veterinary Parasitology** v. 119, p. 247–257, 2004
- LIN D., ZHOU Q., XU Y., CHEN C., LIU Y. Physiological and molecular responses of the earthworm (*Eisenia fetida*) to soil chlortetracycline contamination. **Environmental Pollution** v. 171, p. 46-51, 2012.
- LIN, D.S., ZHOU, Q.X., XIE, X.J., LIU, Y. Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*). **Chemosphere** 81: 1328-1333. 2010.
- LUMARET J. P., ERROUISSI F., FLOATE K., RÖMBKE J., WARDHAUGH K. A Review on the Toxicity and Non-Target Effects of Macrocyclic Lactones in Terrestrial and Aquatic Environments. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, p. 1004-1060, 2012.
- LUO Y R, WANG S H, YUN M X, LI X Y, WANGE, J J, SUN Z J. The toxic effects of ionic liquids on the activities of acetylcholinesterase and cellulase in earthworms. **Chemosphere** 77:313–318; 2009.
- MA, L.L., MA, C., SHI Z.M., LI W.M., XU L., HU F., LI H.X. Effects of fluoranthene on the growth, bioavailability and anti-oxidant system of *Eisenia fetida* during the ageing process. **European Journal of Soil Biology** v. 50, p. 21 – 27, 2012.
- MAITY S, ROY S, CHAUDHURY S, BHATTACHARYA S. Antioxidant responses of the earthworm *Lampito mauritii* exposed to Pb and Zn contaminated soil. **Environmental Pollution**, v. 151, p. 1–7, 2008.

- MONSERRAT, J M.; GERACITANO, L A.; PINHO, G L. L. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylenol orange complex formation. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 45, n. 2, p.177-183, aug., 2003.
- NIE XP, LIU BY, YU HJ, LIU WQ, YANG YF. Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole exposure to the antioxidant system in *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Environmental Pollution** 172: 23-32. 2013.
- NUNES M. E. T., ESPÍNDOLA E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology** May; v. 21(4), p.1063-1071, 2012.
- OECD. Guidelines for Testing of Chemicals, Earthworm, Acute Toxicity Tests (Filter Paper Test and Artificial Soil Test), **Organization for Economic Cooperation and Development**, vol. 207, Paris. 1984.
- RAO, J.V., PAVAN, Y.S., MADHAVENDRA, S.S. Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 54, 296–301.; 2003.
- RAULT M, MAZZIA C, CAPOWIEZ Y. Tissue distribution and characterization of cholinesterase activity in six earthworm species. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B** 147:340–346; 2007.
- RIZWAN-UL-HAQ M., ZHENLING Z., YONGXUE S., WENGUANG X. Evaluation of glutathione s-transferase as toxicity indicator for roxarsone and arsanilic acid in *Eisenia fetida*. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, p. 731–738, 2012.
- RÖMBKE, J., KROGH, K.A., MOSER, T., SCHEFFCZYK, A., LIEBIG, M. Effects of the veterinary pharmaceutical ivermectin on soil invertebrates in laboratory tests. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p. 332 – 340, 2010.
- SAINT-DENIS M, LABROT F, NARBONNE JF, RIBERA D. Glutathione, glutathione related enzymes and catalase activities in the earthworms *Eisenia fetida andrei*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 35, 602–614; 1998.
- SCHRECK, E., GERET, F., GONTIER, L., TRILHOU, M. Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. **Chemosphere** 71, 1832–1839, 2008.
- SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. W.; DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **The Biochemical Journal**. V. 360, p. 1 – 16. 2001.
- SHOOP, W.L., MROZIK, H., FISHER, M.H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Veterinary Parasitology** 59, 139-156; 1995.
- SUAREZ, V. H. Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. **Veterinary Research**, v. 33, p. 563–573, 2002.

- SUN Y, DIAO X, ZHANG Q, SHEN J. Bioaccumulation and elimination of avermectin B1a in the earthworms (*Eisenia fetida*). **Chemosphere** 60:699–704; 2005.
- SVENDSEN, T.S., GRØNVOLD, J., HOLTER, P., SOMMER, C. Field effects of ivermectin and fenbendazole on earthworm populations and the disappearance of dung pats from bolus-treated cattle. **Applied Soil Ecology** 24:207–218; 2003.
- VELKI M., HACKENBERGER B. K. Biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei* exposed to pirimiphos-methyl and deltamethrin using different toxicity tests. **Chemosphere** 90: 1216–1226. 2013.
- WANG, Y., CANG T., ZHAO X., YU R., CHEN L., WU C., WANG Q. Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm, *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 79, p. 122–128, 2012.
- XIAO N., JING B., GE F., LIU X. The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to *Eisenia fetida* under laboratory conditions. **Chemosphere** 62: 1366–137. 2006.
- XIE X., WU Y., ZHU M., ZHANG Y-K, WANG X. Hydroxyl radical generation and oxidative stress in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to decabromodiphenyl ether (BDE-209). **Ecotoxicology** 20:993–999. 2011.
- XUE YG, GU XY, WANG XR, SUN C, XU XH, SUN J, ZHANG BG. The hydroxyl radical generation and oxidative stress for the earthworm *Eisenia fetida* exposed to tetrabromobisphenol A. **Ecotoxicology** 18: 693 – 699. 2009.
- YANG X., SONG Y., ACKLAND M. L., YANG LIU., CAO X. Biochemical Responses of Earthworm *Eisenia fetida* Exposed to Cadmium-Contaminated Soil with Long Duration. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, p.1148–1153, 2012.
- ZHANG Y., SHEN G., YU Y., ZHU H. The hormetic effect of cadmium on the activity of antioxidant enzymes in the earthworm *Eisenia fetida*. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 3064–3068, 2009.

7. ARTIGO 3

Ivermectina induz hormese sobre *Eisenia foetida* durante a vermicompostagem de esterco bovino.

Resumo: A maioria dos medicamentos veterinários são excretados nas fezes de animais tratados e tem sido demonstrado que os componentes do grupo das avermectinas podem ter efeitos nocivos sobre os organismos não-alvo que utilizam as fezes. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da ivermectina em minhocas *Eisenia foetida*, através da análise de sobrevivência, crescimento, produção de casulos e atividades enzimáticas durante a vermicompostagem de esterco bovino em condições de laboratório. Além disso, as alterações químicas e a atividade microbiana do vermicomposto, também foram estudadas. Não houve efeitos negativos da ivermectina sobre a mortalidade de minhocas. Da mesma forma, as características químicas e a atividade microbiana do vermicomposto não foram afetados. No entanto, os resultados demonstraram que a ivermectina em baixas concentrações induz um aumento na atividade da fosfatase alcalina e no crescimento de *Eisenia foetida*, mas altas concentrações inibiram estes parâmetros, e este foi refletido numa curva em forma de U invertido, uma representação gráfica do efeito hormético. A presença da hormese induzida pela ivermectina em minhocas pode estar relacionada a ativação de vias de adaptação.

Palavras-chave: efeito hormético, fármacos veterinários, minhocas, toxicidade.

Ivermectin induces hormesis on *Eisenia foetida* during the vermicomposting of cattle manure.

Abstract: Most of the veterinary pharmaceuticals are excreted in the faeces of treated animals and it has been demonstrated that members of the avermectin group may have deleterious effects on non-target organisms utilising the faeces. The objective of this study was to evaluate the influence of ivermectin on *Eisenia foetida* earthworms, by analysing survival, growth, cocoon production and enzyme activities during the vermicomposting of cattle manure under laboratory conditions. Furthermore, the chemical changes and microbial activity of the vermicompost, were also studied. There was no negative effects of ivermectin on mortality of earthworms. Likewise the chemical characteristics and microbial activity of vermicompost were not affected. However, the results showed that ivermectin at low concentrations induces an increase in the activity of alkaline phosphatase and growth of *Eisenia foetida*, but high concentrations inhibited these endpoints, and this was reflected in an inverted U-shaped curve, a graphic representation of hormetic effect. The presence of

36 hormesis induced by ivermectin in the earthworms may be related to activation of adaptive
37 pathways.

38 **Key words:** earthworms, hormetic effect, toxicity, veterinary pharmaceuticals.

39

40

41

INTRODUÇÃO

42 A tecnologia da vermicompostagem adquiriu fundamental importância na atualidade,
43 porque pode ser utilizada como forma de biorremediação para promover a biodegradação de
44 contaminantes orgânicos e a reciclagem dos resíduos de fontes agroindustriais (Da Silva et al.,
45 2002; Yadav & Garg, 2011).

46 Embora os microrganismos participem ativamente nas transformações bioquímicas do
47 processo de vermicompostagem, as minhocas atuam de forma decisiva conduzindo a
48 decomposição pela ingestão e fragmentação da matéria orgânica (Aira & Domínguez 2009).
49 Além disso, estudos demonstram que as minhocas possuem uma série de enzimas digestórias
50 que atuam na degradação dos resíduos orgânicos para formar o vermicomposto (Prabha et al.
51 2007, Ueda et al. 2008).

52 A pecuária intensiva produz uma enorme quantidade de resíduos sólidos, como os
53 excrementos de animais e, em muitos casos, tais resíduos podem ser adequadamente e
54 plenamente aproveitados. Desta forma, o esterco bovino tornou-se o principal substrato
55 orgânico usado como matéria prima para o processo de vermicompostagem (Garg et al.,
56 2006).

57 Entretanto, há um risco ecológico no uso de estercos como fonte de nutrientes para o solo,
58 pois o controle das principais enfermidades associadas à produção pecuária é fortemente
59 dependente da utilização sistemática e, por vezes abusiva de drogas anti-helmínticas,
60 resultando na presença de vários compostos e metabólitos oriundos de fármacos veterinários
61 que são eliminados nas fezes de animais tratados (Floate et al., 2005).

62 A ivermectina, uma lactona macrocíclica pertencente à classe das avermectinas, é
63 comumente e globalmente aplicada para eliminar ectoparasitas e nematoides gastrointestinalmente de
64 uma variedade de espécies animais, sofre pouca metabolização e é parcialmente excretada de
65 forma inalterada pelas fezes de animais tratados (Lumaret et al., 2012).

66 Dependendo da formulação comercial de ivermectina utilizada, as concentrações
67 ambientais do fármaco podem atingir até 20 mg kg⁻¹ peso seco (Floate et al., 2005),
68 persistindo por dias a meses tanto em estercos como no solo (Iglesias et al., 2006, Krogh et
69 al., 2009).

70 Têm-se demonstrado que a presença de resíduos ambientais de fármacos veterinários,
71 principalmente da classe das avermectinas, afetam organismos não-alvo que habitam os

72 esterco e o solo, levando as agências internacionais de regulação ambiental emitirem alertas
73 sobre o risco de substâncias potencialmente tóxicas excretadas por animais de produção
74 (Lumaret et al., 2012; Blanckenhorn et al., 2013).

75 Embora as pesquisas conduzidas por Svendsen et al. (2003) e Kaneda et al. (2006)
76 apontem que as concentrações ambientalmente relevantes de ivermectina não afetam as
77 minhocas, outros estudos demonstraram que este endectocida prejudica os aspectos
78 reprodutivos como a produção e a eclodibilidade dos casulos (Gunn & Sadd 1994; Rombke et
79 al., 2009), enquanto que a mortalidade só é evidenciada em concentrações elevadas (Sun et
80 al., 2005, Wang et al., 2012).

81 Recentemente, têm-se observado uma reemergência de estudos científicos em relação a um
82 fenômeno conhecido como efeito hormético (Calabrese 2005)

83 A hormese é um conceito toxicológico que se refere a uma dose-resposta bifásica (não
84 monotônica) a um agente ambiental e que é caracterizada pela estimulação em baixas
85 concentrações e uma inibição em concentrações elevadas (Calabrese & Blain 2011).
86 Entretanto, a correta detecção e estimação deste efeito dependem da aplicação de modelos
87 estatísticos adequados (Deng et al., 2001; Zhu et al., 2013). Desta forma, a relação entre a
88 área sob as curvas hormética e do ponto de equivalência zero (AUC_H/AUC_{ZEP}) pode ser usada
89 como estimativa da magnitude do efeito hormético e também identificar os parâmetros que
90 desempenham um importante papel neste processo (Deng et al, 2001).

91 Em minhocas *Eisenia foetida* tem-se demonstrado que elementos químicos como o cádmio
92 e compostos orgânicos da classe dos organofosforados induzem efeito hormético sobre
93 enzimas anticolinérgicas e antioxidantes (Hackenberger et al., 2008; Zhang et al., 2009), no
94 entanto, este efeito ainda não foi estudado em organismos expostos à IVM.

95 O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito de concentrações sub-letais de
96 ivermectina sobre o desenvolvimento, produção de casulos e atividade das enzimas aspartato
97 aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP) e α -amilase (AMIL) de *Eisenia foetida*
98 durante o processo de vermicompostagem de esterco bovino, investigando também se as
99 concentrações utilizadas induzem efeito hormético sobre os parâmetros analisados. Bem
100 como, determinar se este endectocida altera a atividade microbiana e os atributos químicos do
101 vermicomposto.

102

103

MATERIAL E MÉTODOS

104

105 As condições metodológicas da pesquisa seguiram as recomendações descritas por Gao et
106 al. (2007), utilizando-se como substrato teste esterco bovino livre de urina e oriundo de

107 animais que não sofreram nenhum tipo de tratamento químico por pelo menos sessenta dias.
108 As características químicas do substrato utilizado foram: umidade 70%; pH 8,4; carbono
109 orgânico 465,3 g kg⁻¹; nitrogênio total 11,2 g kg⁻¹; fósforo total 3,5 g kg⁻¹; potássio total 6,6 g
110 kg⁻¹; cálcio total 13,5 g kg⁻¹; magnésio total 4,4 g kg⁻¹ e a relação C/N 41:1.

111 A ivermectina (Lote 071M1916), adquirida da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São
112 Paulo – SP, Brasil, com grau de pureza superior a 98%, foi inicialmente dissolvida em
113 acetona e em seguida, misturada com o substrato para atingir as concentrações de 0, 1, 5, 10,
114 50 e 100 mg kg⁻¹ de peso seco. Posteriormente, foi adicionada água destilada à mistura para
115 atingir o equivalente em peso úmido de 75%.

116 Quatro repetições para cada concentração e controles foram preparados e um total de 10
117 minhocas pesadas individualmente (330 ± 2 mg, servindo como 10 réplicas) foram
118 adicionadas em cada recipiente. Então, os recipientes foram mantidos a 21 ± 2°C em
119 fotoperíodo de 12 h luz 12 h⁻¹ escuro, com intensidade luminosa de 400–800 lux e umidade de
120 75% em câmara climatizada modelo 347 CDG – FANEM/SP. As minhocas utilizadas neste
121 ensaio foram adultas com clitelo desenvolvido e peso entre 300-400 mg.

122

123 **Mortalidade, taxa de desenvolvimento e produção de casulos de *Eisenia foetida*.**

124 A mortalidade da *E. foetida* foi determinada pela contagem do número de minhocas não
125 sobreviventes aos 7, 14 e 28 dias do experimento. As minhocas foram consideradas mortas
126 quando elas não possuíssem movimento e não respondessem a nenhum estímulo tátil definido
127 até a porção final anterior.

128 Os pesos das minhocas nos diferentes grupos de concentração testadas foram relatados a
129 partir do início do período de exposição e foram usados para calcular a taxa de
130 desenvolvimento.

131 O efeito da ivermectina sobre a capacidade reprodutiva de *Eisenia foetida* foi avaliada
132 mediante a produção de casulos. Após o período de exposição de 28 dias, as minhocas foram
133 retiradas do substrato e então foram contados manualmente o número de casulos produzidos
134 em cada repetição.

135

136 **Preparo das amostras e determinações enzimáticas em *E. foetida***

137

138 Vinte e quatro horas antes da realização das análises bioquímicas, as minhocas foram
139 retiradas dos substratos teste e colocadas em placas de Petri sobre papel filtro Whatman n° 1
140 umedecido, sob temperatura de 21 ± 2°C com luz 12:12 h: ciclo claro-escuro, para
141 esvaziamento do conteúdo do trato digestório e em seguida armazenadas em nitrogênio
142 líquido no Laboratório de Bioquímica e Toxicologia Animal – CCR/URCAMP-Bagé, RS.

143 Posteriormente, as minhocas foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl (0,1 Mol L⁻¹, pH
144 7,6) em quatro partes (4:1 peso:volume), contendo fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF; 0,1
145 mmol L⁻¹) como inibidor de proteases, usando um homogeneizador de tecidos *Heidolph* a
146 6.000 rpm. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 3.000 g por 30 min em uma
147 centrífuga Coleman modelo 90-1, resultando em um sobrenadante (S1) que foi utilizado para
148 a medição das atividades enzimáticas. Todos os preparos teciduais foram realizados a 4°C.

149 O conteúdo proteico total dos sobrenadantes foi determinado pela reação de biureto
150 utilizando-se um kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) realizado em triplicatas à
151 545 nm.

152 As avaliações das atividades das enzimas α -amilase, fosfatase alcalina e aspartato
153 aminotransferase foram realizadas utilizando-se kit bioquímico da Biotécnica Ltda (Varginha
154 – MG). A atividade específica de cada enzima foi expressa como μmol do produto formado
155 mg^{-1} proteína min^{-1} .

156

157 **Atividade microbiana e avaliação química do vermicomposto.**

158

159 A atividade microbiana foi avaliada nos grupos experimentais nos dias 0, 7, 14, 21 e 28
160 pela taxa de evolução do CO₂ da amostra durante 24 h de incubação. O CO₂ foi capturado em
161 uma solução de NaOH 0,05 mol L⁻¹ e subsequentemente mensurado pela titulação da
162 fenolftaleína com HCl, após adição de excesso de BaCl₂. A atividade microbiana foi expressa
163 como $\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}$ vermicomposto h^{-1} (Atiyeh et al., 2000).

164 O substrato inicial (esterco bovino) e os vermicompostos obtidos no experimento foram
165 analisados para suas características químicas no Laboratório de Química do Departamento de
166 Solos da FAEM/UFPEL, onde foram determinados: pH, umidade, nitrogênio, fósforo, potássio,
167 cálcio, magnésio, carbono e a relação C/N. Os métodos utilizados foram descritos por
168 Tedesco et al. (1995).

169

170 **Análise estatística**

171 Os testes paramétricos foram precedidos por Shapiro-Wilk para distribuição normal e pelo
172 teste de Levene para a homogeneidade das variâncias. Diferenças significativas foram
173 testadas pela análise de variância (ANOVA) e as comparações *post hoc* foram realizadas pelo
174 teste de Duncan para as médias entre os grupos expostos e o grupo controle. As diferenças
175 entre os grupos foram consideradas significantes à $P < 0.05$, utilizando-se o programa IBM
176 SPSS 20.

177 A determinação da atividade enzimática relativa foi realizada pela transformação dos
 178 dados da atividade enzimática específica como percentual (%) em relação ao grupo controle
 179 (dose 0 mg kg⁻¹) através da fórmula: (valor obtido – valor do controle/valor do controle)*100,
 180 conforme Zhang et al. (2009).

181 Adicionalmente, foi aplicada a função cúbica sobre os dados obtidos para descrever uma
 182 relação dose-resposta à incorporação de efeito hormético. A extensão da hormese foi estimada
 183 de acordo com Deng et al., (2001) como demonstrado na equação (1), pela relação de
 184 AUC_H/AUC_{ZEP}, utilizando o método integral direto através do programa SIGMA PLOT 10.0.

185

$$186 \quad P = \frac{AUC_H}{AUC_{ZEP}} \cdot 100\% = \frac{\int_{ZEP_1}^{ZEP_2} f(x) dx - Y_0(ZEP_2 - ZEP_1)}{\int_{ZEP_1}^{ZEP_2} f(x) dx} \cdot 100 \quad (1)$$

187

188

189

189 RESULTADOS E DISCUSSÃO

190

191 Não foi observado mortalidade de minhocas em nenhum dos tratamentos ao longo dos 28
 192 dias de exposição à IVM em esterco bovino utilizado como substrato teste. Desta forma, a
 193 CL₅₀ foi determinada como > 100 mg kg⁻¹ substrato (peso seco), confirmando o carácter de
 194 subletalidade das concentrações testadas.

195 Resultados contraditórios são encontrados com testes de toxicidade da IVM sobre *E.*
 196 *foetida*. Pesquisa conduzida por Halley et al. (1989) demonstraram que a CL₅₀ de IVM é de
 197 314 mg kg⁻¹ solo, enquanto Gunn e Sadd (1994) observaram não haver sobrevivência em
 198 solos quando a concentração de IVM alcança 16 mg kg⁻¹, da mesma forma Sun et al. (2005)
 199 verificaram mortalidade à 24.1 mg kg⁻¹ e Wang et al. (2012) à 68.11 mg kg⁻¹ solo (peso seco)
 200 para a mesma substância.

201 Os resultados referentes à taxa de desenvolvimento, produção de casulos e atividades
 202 enzimáticas específicas da AST, FALC e AMIL de minhocas *E. foetida* expostas a diferentes
 203 concentrações de IVM durante o período experimental podem ser observados como valores da
 204 média, desvio padrão e indicação de diferenças significativas pelo teste de Duncan (Tabela1).

205

206

207

208

209

210 Tabela 1. Parâmetros relacionados à *Eisenia foetida* e a atividade microbiana do
 211 vermicomposto após 7, 14 e 28 dias de exposição à várias concentrações de ivermectina
 212 (IVM). Médias seguidas de letras iguais na linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan.

Parâmetro	Exposição (dias)	Concentração IVM (mg kg ⁻¹ substrato)					
		0	1	5	10	50	100
Desenvolvimento (%)	7	25 ± 8,8 ^a	25 ± 9,6 ^a	28 ± 2,2 ^a	39 ± 4,6 ^b	10 ± 3,1 ^c	-4 ± 7,1 ^d
	14	44 ± 5,1 ^{ab}	47 ± 8,4 ^a	52 ± 0,9 ^a	56 ± 8,1 ^a	33 ± 0,6 ^b	-2 ± 8,9 ^c
	28	50 ± 8,8 ^b	72 ± 9,3 ^a	68 ± 9,9 ^{ab}	61 ± 13,7 ^{ab}	66 ± 7,9 ^{ab}	50 ± 2,8 ^b
Casulos (produção média minhoca ⁻¹)	28	8 ± 0,6 ^{ab}	8,4 ± 1,5 ^a	9,2 ± 0,2 ^a	8,4 ± 0,6 ^a	6,6 ± 0,4 ^b	2,5 ± 1 ^c
Atividade AST (µmol NADH mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)	7	8,7 ± 0,4 ^a	8,6 ± 1,2 ^a	8,8 ± 0,5 ^a	8,5 ± 0,9 ^a	8,5 ± 0,2 ^a	8,5 ± 0,8 ^a
	14	8,6 ± 0,5 ^a	8,7 ± 1,2 ^a	8,7 ± 0,5 ^a	8,6 ± 0,9 ^a	8,5 ± 0,2 ^a	8,4 ± 0,9 ^a
	28	9,8 ± 0,6 ^a	9,7 ± 1,7 ^a	8,7 ± 0,4 ^a	8,6 ± 1,2 ^a	8,5 ± 0,9 ^{ab}	6,9 ± 1,4 ^b
Atividade FALC (µmol PNF mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)	7	10,4 ± 0,9 ^a	11,3 ± 1,1 ^a	11,7 ± 2,4 ^a	11,2 ± 0,8 ^a	9,9 ± 1,7 ^a	9,7 ± 0,2 ^a
	14	7,7 ± 1,1 ^{ab}	8,5 ± 0,8 ^{ab}	9 ± 1,3 ^a	9 ± 1,4 ^a	7,8 ± 1,1 ^{ab}	6,3 ± 1,4 ^b
	28	7,7 ± 1,3 ^{ab}	8,4 ± 0,7 ^a	8,9 ± 1,1 ^a	8,2 ± 2,1 ^{ab}	7,7 ± 1,2 ^{ab}	6,1 ± 1,3 ^b
Atividade AMIL (µmol CNP mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)	7	9,9 ± 1,2 ^a	9,1 ± 0,9 ^a	8,8 ± 1,7 ^a	8,9 ± 2,1 ^a	9,5 ± 0,6 ^a	9,1 ± 0,9 ^a
	14	8,9 ± 0,7 ^a	9,2 ± 0,7 ^a	10,1 ± 0,8 ^a	10,9 ± 1 ^a	10,4 ± 1 ^a	10,2 ± 1 ^a
	28	11,3 ± 2,9 ^a	11,4 ± 1,9 ^a	11,1 ± 1,4 ^a	10,3 ± 0,8 ^a	9,5 ± 2,8 ^a	9,4 ± 0,9 ^a
Atividade microbiana (µg CO ₂ g ⁻¹ substrato h ⁻¹)	7	0,25 ± 0,3 ^a	0,25 ± 0,4 ^a	0,24 ± 0,3 ^a	0,26 ± 0,5 ^a	0,25 ± 0,4 ^a	0,24 ± 0,3 ^a
	14	0,23 ± 0,4 ^a	0,22 ± 0,3 ^a	0,23 ± 0,3 ^a	0,24 ± 0,5 ^a	0,23 ± 0,6 ^a	0,22 ± 0,3 ^a
	28	0,22 ± 0,5 ^a	0,23 ± 0,3 ^a	0,23 ± 0,5 ^a	0,24 ± 0,3 ^a	0,21 ± 0,4 ^a	0,22 ± 0,5 ^a

213

214 Dependendo da formulação comercial de ivermectina, após sua metabolização e excreção,
 215 as concentrações ambientalmente relevantes do fármaco no esterco podem alcançar até 20 mg
 216 kg⁻¹ peso seco (Floate et al., 2005).

217 De acordo com as condições metodológicas utilizadas neste estudo, a IVM em baixas
 218 concentrações não afeta negativamente a taxa de desenvolvimento e atividade microbiana
 219 (tabela 1), corroborando com as pesquisas conduzidas por Svendsen et al. (2003), Kaneda et
 220 al. (2006) e Iglesias et al. (2011). No entanto, Gunn e Sadd (1994) encontraram prejuízo no
 221 crescimento de minhocas expostas durante 14 dias a 4,7 mg kg⁻¹ de IVM, do mesmo modo,
 222 Halley et al. (1989) demonstraram diminuição significativa na biomassa de *E. foetida* aos 28
 223 dias de exposição a 12 mg kg⁻¹.

224 Por outro lado, como demonstrado na tabela 1, nas duas primeiras semanas do experimento
 225 foi verificado diminuição na taxa de desenvolvimento, caracterizada pela redução no peso das
 226 minhocas expostas às duas concentrações mais elevadas de IVM. Este evento pode estar
 227 relacionado ao mecanismo de ação do fármaco em invertebrados que atua mediante a ligação
 228 irreversível e ativação de canais iônicos dependentes de ligante, particularmente, canais

229 cloretos dependentes de glutamato e receptores do ácido γ -aminobutírico (GABA), resultando
230 em paralisia corporal e disfunção dos músculos da faringe (Lumaret et al., 2012).

231 Uma condição observada neste experimento foi que a IVM induziu efeito hormético sobre
232 a taxa de desenvolvimento de *E. foetida*.

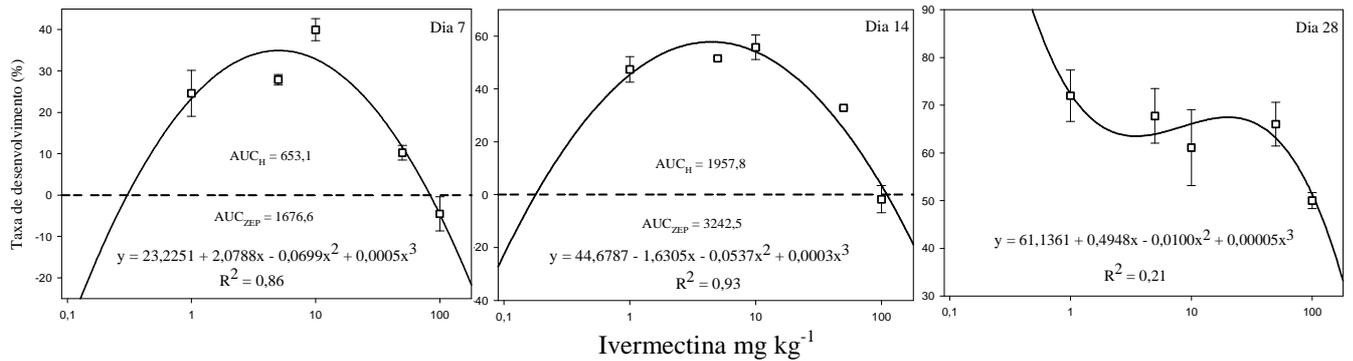
233 A Figura 1 demonstra a estimação da hormese para o parâmetro taxa de desenvolvimento
234 em minhocas *E. foetida* expostas à diferentes concentrações de IVM ao longo de 28 dias do
235 experimento.

236 Sete dias após o início do experimento, os resultados observados para o coeficiente β_1
237 demonstram significância ao nível $\alpha = 0,05$ ($t = 3,22$, $p < 0,01$), indicando que a IVM induz
238 efeito hormético sobre a taxa de desenvolvimento de *E. foetida* durante este período de
239 exposição. A função cúbica pode ser expressa como: $y = 23,2251 + 2,0788x - 0,0699x^2 +$
240 $0,0005x^3$ ($r^2 = 0,86$, $F = 27,68$, $P < 0,0001$) e foi utilizada para a obtenção do ZEP ($ZEP_1 = -$
241 $8,56$; $ZEP_2 = 82,85$).

242 Utilizando o método integral direto descrito por Deng et al. (2001), foi calculada a área
243 hormética AUC_H como 653,1, a AUC_{ZEP} como 1676,6 e a razão entre as duas áreas 38,9%. O
244 efeito hormético máximo obtido aos 7 dias de exposição à IVM foi $Y_{max} = 32,9\%$.

245 A hormese se prolongou até o 14º dia de exposição da *E. foetida* à diferentes concentrações
246 de IVM. O coeficiente β_1 , indicativo de efeito hormético, foi significativo ao nível $\alpha = 0,05$ (t
247 $= 2,79$, $p < 0,05$) e a função cúbica pode ser expressa como: $y = 44,6787 - 1,6305x - 0,0537x^2$
248 $+ 0,0003x^3$ ($r^2 = 0,93$, $F = 63,68$, $P < 0,0001$) e então, utilizada para a obtenção do ZEP (ZEP_1
249 $= -16,9$; $ZEP_2 = 102,1$). Desta forma, a área hormética AUC_H calculada como 1957,8, a
250 AUC_{ZEP} como 3242,5 e a razão entre as duas áreas 60,4%. O efeito hormético máximo obtido
251 aos 14 dias de exposição à IVM foi $Y_{max} = 56,5\%$, comparativamente maior que no sétimo
252 dia, como pode ser verificado na Figura 1.

253 Entretanto, a IVM não induziu hormese aos 28 dias sobre a taxa de desenvolvimento de *E.*
254 *foetida*, como verificado pelo coeficiente β_1 não houve significância ao nível $\alpha = 0,05$ ($t =$
255 $0,44$, $p = 0,67$), sendo a função cúbica expressa como: $y = 61,1361 + 0,4948x - 0,0100x^2 +$
256 $0,00005x^3$ ($r^2 = 0,21$, $F = 1,27$, $P = 0,3218$). Estas observações estão de acordo com os dados
257 disponíveis na literatura, indicando que o efeito hormético apresenta um carácter transitório e
258 que não é apenas uma simples relação dose-resposta, mas também uma relação dose-tempo-
259 resposta (Cedergreen 2008).



260 Figura 1. Efeito hormético sobre a taxa de desenvolvimento em *Eisenia foetida* aos 7, 14 e 28
 261 dias de exposição à diferentes concentrações de ivermectina. Os dados são demonstrados
 262 como média \pm desvio padrão. AUC_H representa a área sob a curva hormética e AUC_{ZEP} indica
 263 a área sob a curva do ponto de equivalência zero.

264

265 Incrementos na taxa de desenvolvimento de minhocas alimentadas com esterco de bovinos
 266 que foram tratados com ivermectina também foram relatados por Svendesen et al. (2005).

267 Não foi constatado efeito hormético ($t = 0,84$, $p = 0,41$) para a produção de casulos, porém,
 268 ocorreu uma redução significativa (ANOVA, $p < 0,05$) evidenciada somente na concentração
 269 mais elevada (100 mg kg^{-1}). Diferentemente, Gunn & Sadd (1994) verificaram que a
 270 concentração de apenas 4 mg kg^{-1} de IVM reduziu a produção de casulos em 56% durante 21
 271 dias em solo artificial.

272 As distintas concentrações de ivermectina não produziram alterações significativas sobre a
 273 atividade específica da enzima AST até os 14 dias de exposição. Por outro lado, foi observado
 274 uma diminuição significativa (ANOVA, $p < 0,05$) desta enzima ao final do período
 275 experimental na concentração de 100 mg kg^{-1} . No entanto, este achado não foi suficiente para
 276 alterar significativamente tanto a relação C/N como a concentração de nitrogênio total do
 277 vermicomposto, como pode ser observado na tabela 2.

278

279 Tabela 2. Atributos químicos do vermicomposto após 28 dias de exposição à várias
 280 concentrações de ivermectina (IVM). Valores seguidos de mesma letra não diferem
 281 significativamente entre si, nas linhas, pelo teste de Duncan.

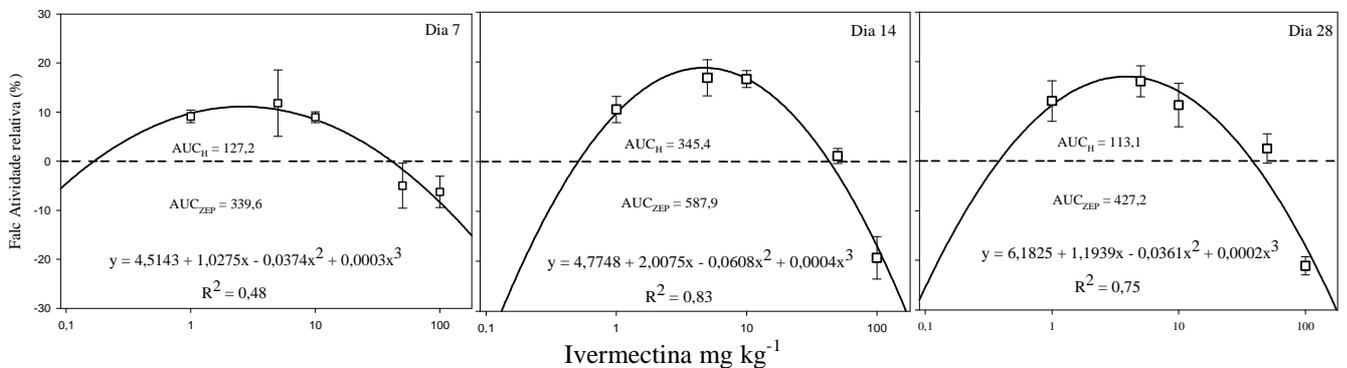
Parâmetro	Concentração IVM (mg kg^{-1} substrato)					
	0	1	5	10	50	100
pH (H_2O)	$8,3 \pm 0,1^a$	$8,3 \pm 0,1^a$	$8,3 \pm 0,1^a$	$8,3 \pm 0,1^a$	$8,3 \pm 0,1^a$	$8,4 \pm 0,1^a$
Carbono (g kg^{-1})	453 ± 20^a	467 ± 8^a	468 ± 16^a	441 ± 4^a	469 ± 14^a	469 ± 27^a
Nitrogênio (g kg^{-1})	$12,8 \pm 0,4^a$	$13,3 \pm 0,4^a$	$13,8 \pm 0,5^a$	$13,1 \pm 0,4^a$	$13,6 \pm 0,4^a$	$14,1 \pm 0,8^a$
Fósforo (g kg^{-1})	$4,2 \pm 0,1^a$	$4,2 \pm 0,2^a$	$4,4 \pm 0,1^a$	$4,3 \pm 0,1^a$	$4,4 \pm 0,2^a$	$4,3 \pm 0,1^a$
Potássio (g kg^{-1})	$7,3 \pm 0,4^a$	$7,1 \pm 0,1^a$	$7,7 \pm 0,1^a$	$7,4 \pm 0,3^a$	$7,4 \pm 0,4^a$	$7,6 \pm 0,3^a$
Cálcio (g kg^{-1})	$13,8 \pm 0,3^a$	$14,7 \pm 0,8^{ab}$	$15,1 \pm 0,4^{bc}$	$14,4 \pm 0,6^{ab}$	$15,8 \pm 0,5^{bc}$	$15,8 \pm 0,6^c$
Magnésio (g kg^{-1})	$4,9 \pm 0,1^a$	$4,9 \pm 0,2^a$	$5,0 \pm 0,1^a$	$5,1 \pm 0,1^a$	$5,2 \pm 0,2^{ab}$	$5,4 \pm 0,1^b$
Relação C/N	$35,3 \pm 1,5^a$	$35 \pm 1,7^a$	34 ± 2^a	$33,7 \pm 0,6^a$	$34,3 \pm 1,1^a$	$33,7 \pm 3,1^a$

282 As enzimas digestórias encontradas em minhocas são responsáveis pela decomposição e
 283 humificação da matéria orgânica (Prabha et al., 2007). Neste sentido, Ueda et al. (2008)
 284 caracterizaram em minhocas *E. foetida* dois tipos de α -amilases com propriedades
 285 termoestáveis, sugerindo que ambas enzimas possuem funções complementares e com alta
 286 atividade hidrolítica sobre o amido. Os resultados encontrados neste trabalho revelam que a
 287 enzima α -amilase de *E. foetida* não foi significativamente afetada durante os diferentes
 288 períodos de exposição à IVM.

289 Ao ser analisadas as atividades relativas da enzima FALC, constatou-se a presença de
 290 efeito hormético produzido pela IVM no 14º e 28º dias de exposição sobre a *E. foetida*
 291 (Figura 2).

292 Aos 14 dias após o início do experimento, os resultados observados para o coeficiente β_1
 293 demonstram significância ao nível $\alpha = 0,05$ ($t = 3,85$, $p < 0,01$), indicando que a IVM induz
 294 hormese sobre a enzima FALC de *E. foetida* a partir deste período de exposição. Então, a
 295 função cúbica pode ser expressa como: $y = 4,7748 + 2,0075x - 0,0608x^2 + 0,0004x^3$ ($r^2 =$
 296 $0,83$, $F = 31,61$, $P < 0,0001$) e $ZEP = 50,84$. A área hormética AUC_H obtida foi 345,4 e a
 297 AUC_{ZEP} foi 587,9, a razão AUC_H/AUC_{ZEP} estimada em 58,7% e o efeito hormético máximo
 298 encontrado foi $Y_{max} = 17,1\%$.

299 A enzima FALC também manifestou hormese no 28º dia de exposição da *E. foetida* à
 300 diferentes concentrações de IVM, no qual o coeficiente β_1 , foi significativo ao nível $\alpha = 0,05$
 301 ($t = 1,91$, $p < 0,05$) e a função cúbica pode ser expressa como: $y = 6,1825 + 1,1939x -$
 302 $0,0361x^2 + 0,0002x^3$ ($r^2 = 0,75$, $F = 20,29$, $P < 0,0001$) e $ZEP = 50,82$. A área hormética
 303 AUC_H obtida foi 113,1 e a AUC_{ZEP} foi 427,2, a razão AUC_H/AUC_{ZEP} estimada em 26,5% e o
 304 efeito hormético máximo encontrado foi $Y_{max} = 15,9\%$, comparativamente menor que no 14º
 305 dia, como pode ser verificado na Figura 2.



306 Figura 2. Efeito hormético sobre a atividade relativa da enzima fosfatase alcalina (Falc) em
 307 *Eisenia foetida* aos 7, 14 e 28 dias de exposição à diferentes concentrações de ivermectina. Os
 308 dados são demonstrados como média \pm desvio padrão. AUC_H representa a área sob a curva
 309 hormética e AUC_{ZEP} indica a área sob a curva do ponto de equivalência zero.
 310

311 Estes resultados estão de acordo com a afirmação de que a resposta máxima da hormese
312 normalmente é modesta, e que diferentes parâmetros podem ser afetados em diferentes
313 concentrações (Calabrese & Blain 2011).

314 Zhang et al (2009) determinaram a magnitude do efeito hormético pela razão
315 AUC_H/AUC_{ZEP} da enzima superóxido dismutase em 52, 8% e para a catalase 36, 8% em
316 minhocas *E. foetida* expostas ao cádmio.

317 O efeito hormético em minhocas do gênero *Eisenia* também foi documentado para a
318 enzima acetilcolinesterase durante a exposição ao inseticida organofosforado temefós
319 (Hackenberger et al., 2008).

320 O fenômeno da hormese está provavelmente relacionado com a ativação de vias de
321 adaptação que são responsáveis pela homeostase celular e fisiológica (Calabrese & Blain
322 2011). Desta forma, o efeito hormético detectado para a enzima fosfatase alcalina pode
323 explicar em parte o efeito observado para o parâmetro taxa de desenvolvimento, pois enzimas
324 desta classe estão envolvidas na diferenciação, proliferação, sinalização celular, meiose,
325 mitose e regulação da síntese do DNA em diversos tipos de organismos (Fernandes et al.,
326 2008).

327

328

CONCLUSÕES

329

330 1. A ivermectina apresenta-se tóxica em altas concentrações no esterco bovino utilizado
331 como substrato teste, mas não mostrou efeitos adversos sobre o crescimento, reprodução e a
332 sobrevivência de minhocas em níveis baixos.

333 2. Não há alterações significativas sobre a atividade microbiana e na maioria dos
334 parâmetros químicos do vermicomposto entre os grupos tratados com ivermectina e o grupo
335 controle.

336 3. Observou-se efeito hormético induzido pela ivermectina sobre a taxa de
337 desenvolvimento e atividade relativa da enzima fosfatase alcalina de *Eisenia foetida*.

338

339

AGRADECIMENTOS

340 Este estudo foi financiado por PROPPEX/URCAMP e PPG-SPAF/UFPel.

341

342

LITERATURA CITADA

343

344 Aira M.; Domínguez J. Microbial and nutrient stabilization of two animal manures after the
345 transit through the gut of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). Journal of
346 Hazardous Materials, v.161, p.1234–1238, 2009.

- 347
348 Atiyeh, R.M.; Domínguez, J.; Subler, S.; Edwards, C.A. Changes in biochemical properties of
349 cow manure during processing by earthworms (*Eisenia andrei*, Bouché) and the effects on
350 seedling growth. *Pedobiologia*, v.44, p.709–724, 2000.
- 351
352 Blanckenhorn, W. F.; Puniamoorthy, N.; Schafer, M. A.; Scheffczyk, A.; Römbke J.
353 Standardized laboratory tests with 21 species of temperate and tropical sepsid flies confirm
354 their suitability as bioassays of pharmaceutical residues (ivermectin) in cattle dung.
355 *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 89, p.21–28, 2013.
- 356
357 Calabrese, E.J. Paradigm lost, paradigm found: the re-emergence of hormesis as a
358 fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environmental Pollution*,
359 v.138, p.378–411, 2005.
- 360
361 Calabrese E. J.; Blain R. B. The hormesis database: The occurrence of hormetic dose
362 responses in the toxicological literature. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.61,
363 p.73–81, 2011.
- 364
365 Cedergreen N. Is the growth stimulation by low doses of glyphosate sustained over time?
366 *Environmental Pollution* v.156, p.1099–1104, 2008.
- 367
368 Da Silva C.D.; Costa L.M.; Matos A.T.; Cecon P.R.; Silva, D.D. Vermicompostagem de lodo
369 de esgoto urbano e bagaço de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e*
370 *Ambiental*, v.6, p.487-491, 2002.
- 371
372 Deng C.; Graham R.; Shukla R. Detecting and estimating hormesis using a model-based
373 approach. *Human and Ecological Risk Assessment*, v.7, p.849-866, 2001.
- 374
375 Fernandes J.; Amorim R.; Azevedo I.; Martins M.J. *In vitro* modulation of alkaline
376 phosphatase activity of *Saccharomyces cerevisiae* grown in low or high phosphate
377 medium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.41, p.41-46, 2008.
- 378
379 Floate K.; Wardhaugh K.; Boxall A.; Sherratt T N. Fecal residues of veterinary parasiticides:
380 Nontarget effects in the pasture environment. *Annual Review of Entomology*, v.50, p.153–
381 79, 2005.
- 382
383 Gao Y.; Sun Z.; Liu Y.; Sun X.; Li Y.; Bao Y.; Wang G. Effect of albendazole anthelmintics
384 on the enzyme activities of different tissue regions in *Eisenia fetida*. *European Journal of*
385 *Soil Biology*, v.43, p.246-251, 2007.
- 386
387 Garg V. K.; Yadav Y. K.; Sheoran A.; Chand S.; Kaushik P. Livestock excreta management
388 through vermicomposting using an epigeic earthworm *Eisenia foetida*. *Environmentalist*,
389 v.26, p.269–276, 2006.
- 390
391 Gunn A.; Sadd JW. The effect of ivermectin on the survival, behaviour and cocoon
392 production of the earthworm *Eisenia fetida*. *Pedobiologia*, v.38, p.327–333, 1994.
- 393
394 Hackenberger B. K.; Perkusic J.; Stepic S. Effect of temephos on cholinesterase activity in the
395 earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Ecotoxicology and Environmental*
396 *Safety*, v.71, p.583–589, 2008.

- 397 Halley B.A.; Jacob T.A.; Lu A.Y. The environmental impact of the use of ivermectin.
398 Environmental effects and fate. *Chemosphere*, v.18, p.1543-1563, 1989.
399
- 400 Iglesias L. E.; Fusé L. A.; Lifschitz A. L.; Rodríguez E. M.; Sagüés M F.; Saumell C. A.
401 Environmental monitoring of ivermectin excreted in spring climatic conditions by treated
402 cattle on dung fauna and degradation of faeces on pasture. *Parasitology Research*, v.108,
403 p.1185–1191, 2011.
404
- 405 Iglesias L.E.; Saumell C.A.; Fernandez A.S.; Fuse L.A.; Lifschitz A.L.; Rodriguez E.M.;
406 Steffan P.E.; Fiel C.A. Environmental impact of ivermectin excreted by cattle treated in
407 autumn on dung fauna and degradation of faeces on pasture. *Parasitology Research*, v.100,
408 p.93–102, 2006.
409
- 410 Kaneda S.; Yamashita N.; Uchida T.; Shimano S.; Miyoshi N.; Sasaki M.; Enami Y. Effects
411 of ivermectin in dung pats on earthworm (Megascolecidae) populations and pat
412 degradation in Japanese grassland. *Applied Soil Ecology*, v.31, p.280–285, 2006.
413
- 414 Krogh K.A.; Jensen G.G.; Schneider M.K.; Fenner K.; Halling-Sorensen B. Analysis of the
415 dissipation kinetics of ivermectin at different temperatures and in four different soils.
416 *Chemosphere*, v.75, p.1097–1104, 2009.
417
- 418 Lumaret J. P.; Errouissi F.; Floate K.; Römbke J.; Wardhaugh K. A review on the toxicity and
419 non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Current
420 Pharmaceutical Biotechnology*, v.13, p.1004-1060, 2012.
421
- 422 Prabha L M.; Jayaraaj I A.; Jeyaraaj R.; Srinivasa R. Comparative studies on the digestive
423 enzymes in the gut of earthworms, *Eudrilus eugenia* and *Eisenia foetida*. *Indian Journal of
424 Biotechnology*, v.6, p.567-569, 2007.
425
- 426 Rombke J.; Krogh K. A.; Moser T.; Scheffczyk A.; Liebig M. Effects of the veterinary
427 pharmaceutical ivermectin on soil invertebrates in laboratory tests. *Archives of
428 Environmental Contamination and Toxicology*, v.58, p.332-340, 2009.
429
- 430 Sun Y.; Diao X.; Zhang Q.; Shen J. Bioaccumulation and elimination of avermectin B1a in
431 the earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere*, v.60, p.699–704, 2005.
432
- 433 Svendsen T.S.; Grønvold J.; Holter P.; Sommer C. Field effects of ivermectin and
434 fenbendazole on earthworm populations and the disappearance of dung pats from bolus-
435 treated cattle. *Applied Soil Ecology*, v.24, p.207–218, 2003.
436
- 437 Svendsen T. S.; Hansen P. E.; Sommer C.; Martinussen T.; Grønvold J.; Holter P. Life history
438 characteristics of *Lumbricus terrestris* and effects of the veterinary antiparasitic compounds
439 ivermectin and fenbendazole. *Soil Biology & Biochemistry*, v.37, p.927–936, 2005.
440
- 441 Tedesco, M.J.; Gianello, C.; Bissani, C.A.; Bohnen, H.; Volkweiss, S.J. Análises de solo,
442 plantas e outros materiais. 2.ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
443 1995. 174p.
444
- 445 Ueda M.; Asano T.; Nakazawa M.; Miyatake K.; Inouye K. Purification and characterization
446 of novel raw-starch-digesting and cold-adapted α -amylases from *Eisenia foetida*.
447 *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* v.150, p. 125–130, 2008.
448

- 449 Wang Y.; Cang T.; Zhao X.; Yu R.; Chen L.; Wu C.; Wang Q. Comparative acute toxicity of
450 twenty-four insecticides to earthworm, *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental*
451 *Safety*, v.79, p.122–128, 2012.
- 452
- 453 Yadav A.; Garg V.K. Recycling of organic wastes by employing *Eisenia fetida*. *Bioresource*
454 *Technology*, v.102, p.2874–2880, 2011.
- 455
- 456 Zhang Y.; Shen G.; Yu Y.; Zhu H. The hormetic effect of cadmium on the activity of
457 antioxidant enzymes in the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, v.157,
458 p.3064–3068, 2009.

8. ARTIGO 4

USO DO TESTE DE FUGA PARA AVALIAR A SENSIBILIDADE DE *Eisenia foetida* (ANNELIDA, OLIGOCHAETA) À IVERMECTINA EM ESTERCO BOVINO.

Sandro Moreira Tuerlinckx MSc., Médico Veterinário, Doutorando em Agronomia – PPGSPAF/UFPel, Professor – Centro de Ciências Rurais - URCAMP/Av. Tupy Silveira 2099, Centro, CEP 96400-110, Bagé-RS. email: sandromtuer@gmail.com; **Tânia Beatriz Gamboa Araújo Morselli** Dr^a., Agrônoma, Prof^a. Dr^a. PPGA-SPAF/FAEM/UFPel Capão do Leão/RS; **Ana Cláudia Kalil Huber** Dr^a., Agrônoma, Prof^a. Dr^a. AGRONOMIA - URCAMP-Bagé RS.

Resumo

As minhocas são importantes organismos terrestres usados como modelo em testes de toxicidade. Até o presente momento, uma série de ensaios padronizados utilizando *Eisenia foetida* e centradas sobre a mortalidade, reprodução e comportamento (fuga) estão disponíveis. As mudanças no comportamento são alvos promissores para estudos ecotoxicológicos, porque os resultados podem estar ligados a efeitos ao nível do ecossistema. Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da ivermectina sobre o comportamento de evasão de minhocas. Para os testes de fuga foi utilizado esterco bovino como substrato. Os substratos teste foram contaminados com ivermectina a 0, 1, 5, 10, 50 e 100 mg kg⁻¹. A espécie utilizada no ensaio foi *Eisenia foetida*. As minhocas foram expostas aos substratos contaminados e a resposta de evasão (48 h) foi determinada, pela fuga das minhocas. Os resultados mostram que o teste de fuga não foi suficiente para determinar a toxicidade da ivermectina para *Eisenia foetida* em esterco bovino. As minhocas não responderam à presença da substância química, mesmo com um aumento na concentração do produto. Palavras-chave: comportamento, minhocas, toxicidade.

USING AVOIDANCE TEST TO ASSESS THE SENSITIVITY OF *Eisenia foetida* (ANNELIDA, OLIGOCHAETA) TO IVERMECTIN IN CATTLE MANURE.

Abstract

Earthworms are important terrestrial model organisms requiring toxicity testing. To date, a number of normalized tests using *Eisenia foetida* and focusing on mortality, reproduction and behaviour (avoidance) are available. Changes in behaviour are promising targets for ecotoxicological studies because the results can be linked to effects at the ecosystem level. This work aims to assess the effects of ivermectin on the avoidance behaviour of earthworms. The avoidance tests were run with substrate cattle manure. Test substrates were contaminated with ivermectin at 0, 1, 5, 10, 50 and 100 mg kg⁻¹. The test species was *Eisenia foetida*. The earthworms were exposed to the contaminated substrates and avoidance response (48 h) determined. The results show that avoidance test was not adequate to determine the toxicity of ivermectin for *Eisenia foetida* in cattle manure. The earthworms do not responded to the presence of the chemical substance, even with an increase in concentration of product. Keywords: behaviour, earthworms, toxicity.

Introdução

A intensificação da agricultura induz uma redução gradual do teor de matéria orgânica no solo, afetando a produtividade das culturas. Neste contexto, a reciclagem de resíduos orgânicos em áreas agrícolas é uma das maneiras recomendadas para eliminar esterco provenientes da atividade pecuária, contribuindo com o enriquecimento dos solos pela adição de matéria orgânica e nutrientes (Petersen et al., 2003; Antolín et al., 2005). No entanto, esta prática não é isenta de riscos, pois os resíduos podem conter poluentes e patógenos que representam um problema para as plantas, animais e saúde humana (Westerman & Bicudo, 2005).

Vários testes de toxicidade aguda e de reprodução com os organismos do solo, como as minhocas (*Eisenia foetida* e *Eisenia andrei*), estão disponíveis atualmente (OECD 1984; ISO 1993; ISO 1998; OECD 2004).

Em testes ecotoxicológicos de curto prazo, os testes comportamentais de evasão ou fuga são altamente sensíveis para avaliar a contaminação do solo (Schaefer, 2003; Hund-Rinke et al., 2003; Natal-da-Luz et al., 2004; Loureiro et al., 2005; Garcia et al., 2008).

O princípio do teste de fuga está baseado no fato de que as minhocas têm receptores químicos nos segmentos anteriores e tubérculos sensoriais ao longo da sua superfície corpórea, as quais lhes permitem detectar a presença de vários contaminantes diferentes (Reinecke et al., 2002). Este teste é considerado ideal para uma triagem inicial da qualidade do solo, pois é fácil e rápido de ser realizado (Schaefer, 2003). Um protocolo padrão para determinar a função de habitat dos solos através de testes de evasão com minhocas foi estabelecido pela ISO (2008).

As minhocas têm demonstrado evitar solos contaminados com fungicidas (Garcia et al., 2008; Natal-da-Luz et al., 2008), inseticidas (Zhou et al., 2007; Reinecke e Reinecke, 2007) e herbicidas (Marques et al. 2009).

Recentemente, Nunes e Espíndola (2012) relataram que minhocas *Eisenia andrei* apresentam comportamento de fuga em solo artificial contaminado com a lactona macrocíclica abamectina. Estudos demonstram que há uma correlação negativa com o número de minhocas em fezes de animais tratados com ivermectina (Yeates et al., 2007), entretanto, há evidências opostas, indicando ocorrer atração de *Eisenia foetida* em solo artificial contaminado com esta substância (Torkhani et al., 2011).

As avermectinas são substâncias semi-sintéticas derivadas do microrganismo de solo *Streptomyces avermitilis*, possuem atividade acaricida e anti-helmíntica e pertencem a um grupo químico chamado de macrolactonas ou lactonas macrocíclicas (Shoop et al., 1995).

A ivermectina é comumente aplicada para eliminar ectoparasitas e nematoides gastrointestinalmente de uma variedade de espécies animais, ocorre pouca metabolização e é parcialmente excretada de forma inalterada pelas fezes de animais tratados (Floate et al. 2005, Lumaret et al. 2012). Esta

molécula adsorve fortemente a matéria orgânica (Halley et al., 1989), possuindo um baixo potencial de dessorção (Krogh et al., 2008) e, conseqüentemente, um baixo potencial de lixiviação (Oppel et al., 2004), persistindo por dias a meses tanto em esterco como no solo (Iglesias et al., 2006; Fernandez et al., 2009; Krogh et al., 2009; Horvat et al., 2012).

Sua baixa solubilidade em água e rápida fotodegradação pode indicar baixo risco ambiental (Mougin et al., 2003). No entanto, estudos têm demonstrado efeitos danosos deste fármaco sobre organismos não-alvo, tanto aquáticos quanto terrestres (Lumaret et al., 2012; Blanckenhorn et al., 2013).

Mesmo que as pesquisas conduzidas por Svendsen et al. (2003) e Kaneda et al. (2006) apontem que as concentrações ambientalmente relevantes de ivermectina não afetam as minhocas, outros estudos demonstraram que este endectocida prejudica os aspectos reprodutivos como a produção e a eclodibilidade dos casulos (Gunn & Sadd 1994; Rombke et al., 2009), enquanto que a mortalidade só é evidenciada em concentrações elevadas (Sun et al., 2005, Wang et al., 2012).

Embora existam dados relatando os efeitos da ivermectina sobre minhocas em solos naturais e artificiais, não foram encontrados estudos na literatura demonstrando as respostas comportamentais destes organismos frente a esta substância em esterco bovino como substrato teste. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o comportamento de fuga de *Eisenia foetida* à ivermectina em testes com um substrato formulado com esterco bovino.

MATERIAIS E MÉTODOS

Organismos teste e manutenção da cultura

A escolha do organismo teste, as condições para a sua manutenção no laboratório e os requisitos para a sua utilização nos ensaios foram baseados em protocolos estabelecidos na literatura (OECD 2004, ISO 2008, Nunes & Espíndola, 2012).

Lotes de minhocas *Eisenia foetida* (Lumbricidae, Annelida) foram obtidas a partir do Minhocário da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL – Pelotas/RS) e posteriormente multiplicadas no minhocário da Universidade da Região da Campanha (URCAMP – Bagé/RS).

Então, foram selecionadas 100 minhocas adultas e com clitelo desenvolvido para dar início a uma cultura colocada em substrato de manutenção no Laboratório de Bioquímica e Toxicologia Animal – Centro de Ciências Rurais/URCAMP – Bagé/RS, Brasil.

O substrato de manutenção foi constituído de pó de fibra de coco e esterco bovino seco a 110^oC (50: 50 v/v) em estufa modelo Orion 515 – FANEM/SP, a mistura foi colocada em caixas de

material plástico resistente, com capacidade para 1000g do substrato seco e acrescido de quantidade suficiente de água destilada.

A fibra de coco utilizada foi o substrato pó, adquirido da empresa Projeto Coco Verde, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Antes da utilização, o substrato pó foi sujeito a desfaunização mediante a aplicação de pelo menos dois ciclos de congelamento e descongelamento de 48 h.

O pH do substrato de manutenção foi ajustado e monitorado regularmente para $6,5 \pm 0,5$ por adição suficiente de CaCO_3 quando necessário. A umidade foi ajustada e monitorada visualmente uma vez por semana. Os organismos foram alimentados quinzenalmente com uma dieta suplementada com farinha de aveia pré-cozida em água destilada.

Então, a cultura foi mantida a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ sob condições padronizadas de temperatura ($20^\circ \pm 2^\circ\text{C}$), em ciclo 12 h luz/12 h escuro com intensidade luminosa de 400–800 *lux* e umidade de 75% em câmara climatizada modelo 347 CDG – FANEM/SP.

Substrato e substância química teste

O substrato teste utilizado foi esterco bovino livre de urina e oriundo de animais que não receberam nenhum tipo de tratamento químico por pelo menos sessenta dias, seguindo as recomendações descritas por Gao et al. (2007).

As características químicas do substrato foram analisadas no Laboratório de Química do Departamento de Solos da FAEM/UFPel de acordo com Tedesco et al. (1995), onde foram determinados: umidade 70%; pH 8,4; carbono orgânico $465,3 \text{ g kg}^{-1}$; nitrogênio total $11,2 \text{ g kg}^{-1}$; fósforo total $3,5 \text{ g kg}^{-1}$; potássio total $6,6 \text{ g kg}^{-1}$; cálcio total $13,5 \text{ g kg}^{-1}$; magnésio total $4,4 \text{ g kg}^{-1}$ e a relação C/N 41:1.

A ivermectina (Lote 071M1916), adquirida da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo – SP, Brasil, com grau de pureza superior a 98%, foi inicialmente dissolvida em acetona e em seguida, misturada com o substrato para atingir as concentrações de 0, 1, 5, 10, 50 e 100 mg kg^{-1} de massa seca. Posteriormente, foi adicionada água destilada à mistura para atingir o equivalente em massa úmida de 75%.

Os substratos, depois de serem tratados com IVM foram transferidos para recipientes de plástico, os quais foram colocados em capela de exaustão para permitir a evaporação da acetona residual. Novamente, foi adicionada água para compensar a perda de peso devido a evaporação da acetona.

Teste de fuga

Quarenta e oito horas antes do início dos testes, os organismos foram aclimatados ao substrato teste (sem a presença da substância de ensaio). As minhocas utilizadas neste ensaio foram

adultas com clitelo desenvolvido e peso entre 300-400 mg com pelo menos três meses de idade, mas não mais que um ano, obtidas a partir da cultura padronizada.

Os testes de fuga foram baseados em ISO (2008) e Nunes & Espíndola (2012), realizados sob temperatura controlada a $21 \pm 2^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro, com quatro repetições por tratamento, cada uma composta de recipiente de plástico (18 x 12 x 8 cm) e com tampa perfurada. Os recipientes foram então divididos em dois compartimentos iguais com um divisor de plástico antes da introdução de 50 g (peso seco) de substrato controle no lado direito do recipiente e 50 g (massa seca) dos substratos teste contendo as diferentes concentrações de ivermectina à esquerda. Em seguida, após a remoção do divisor, 10 minhocas, previamente lavadas e secas em papel absorvente, foram colocadas sobre a fronteira que separa os dois substratos. A fim de avaliar o resultado, após 48 h da instalação do teste, o divisor de plástico foi colocado novamente nos recipientes separando o substrato contaminado do substrato controle, então, foram contadas e registradas o número de minhocas em cada lado do recipiente.

Nos testes com os substratos controle e contaminados com ivermectina, a resposta foi calculada com base no percentual de evasão das minhocas, de acordo com a seguinte equação (ISO 2008):

$$\text{Fuga (\%)} = [(n_c - n_t)/N] \times 100$$

Em que, n_c = número de minhocas no substrato controle, n_t = número de minhocas no substrato contaminado com ivermectina, N = número total de minhocas.

Teste duplo-controle

Usando a evasão como um parâmetro, presume-se que os organismos deverão ser distribuídos homogeneamente entre as duas seções do recipiente quando contém o mesmo tipo de solo ou substrato (ISO 2008). Desta forma, um teste de duplo controle foi realizado com 10 repetições. As etapas do ensaio seguem os mesmos critérios como os descritos para os testes de fuga.

Análise estatística

Os resultados foram testados quanto à sua distribuição normal (Teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade das variâncias (Teste de Levene). One-way ANOVA foi utilizada para avaliar os efeitos da IVM sobre a preferência do substrato no teste de fuga. A presença de efeito adverso foi considerada significativa em $p < 0,05$. Para efeito de comparação das médias, foi aplicado o teste *post-hoc* de Duncan. As análises estatísticas foram realizadas com o software IBM-SPSS 20 para Windows.

Resultados e Discussões

De acordo com a ISO (2008), o teste de fuga ou evasão deve ser invalidado se o número de minhocas mortas ou desaparecidas é $> 10\%$ por tratamento. Além disso, a homogeneidade da distribuição das oligoquetas deve ser alcançada no teste, ao encher todo o recipiente de ensaio com o mesmo substrato e assegurar que a orientação dos recipientes testados seja a mesma no ambiente experimental. Em média, a proporção de minhocas não deve ser maior do que 60-40% para uma câmara de duas seções. Neste experimento, os critérios de validade foram cumpridos, uma vez que não houve mortalidade dos organismos e os mesmos foram homogeneamente distribuídos nos dois lados dos recipientes duplo-controle.

Pelo teste de duplo-controle, as minhocas não apresentaram uma distribuição muito diferente nas duas metades do recipiente-teste quando o esterco bovino foi utilizado como substrato, por conseguinte, o teste foi considerado válido. Da mesma forma, não houve mortalidade, contribuindo com o critério de validação de teste. Assim, as modificações introduzidas com o tipo de substrato não alteraram o desempenho do método.

Para testes com agroquímicos, os dados da literatura a respeito de respostas deste organismo são muito variáveis. Garcia et al. (2008) e Loureiro et al. (2005), por exemplo, argumentam que as baixas concentrações de benomil e carbendazim foram detectados pelos organismos, do mesmo modo (Marques et al., 2009), demonstraram que o herbicida penoxsulam e o seu respectivo produto formulado, induzem comportamento de evasão em oligoquetas *Eisenia andrei*. Por outro lado, Hodge et al. (2000) relataram que minhocas *Aporrectodea caliginosa* não evitaram solo contaminado com diazinon e clorpirifós tanto em testes de campo como em testes de laboratório.

Os resultados do teste de fuga aplicado mostram que as minhocas não evitaram os substratos contaminados com ivermectina em qualquer concentração testada (Figura 1).

Os resultados encontrados por Torkhani et al. (2011) demonstraram que ao expor *Eisena foetida* e *Lumbricus terrestris* à ivermectina em solo natural (Lufa 2,2), estes pesquisadores encontraram alta porcentagem de *Eisena foetida* no solo teste contaminado. Os autores relataram não terem encontrado uma explicação para a preferência dos organismos para o solo contaminado.

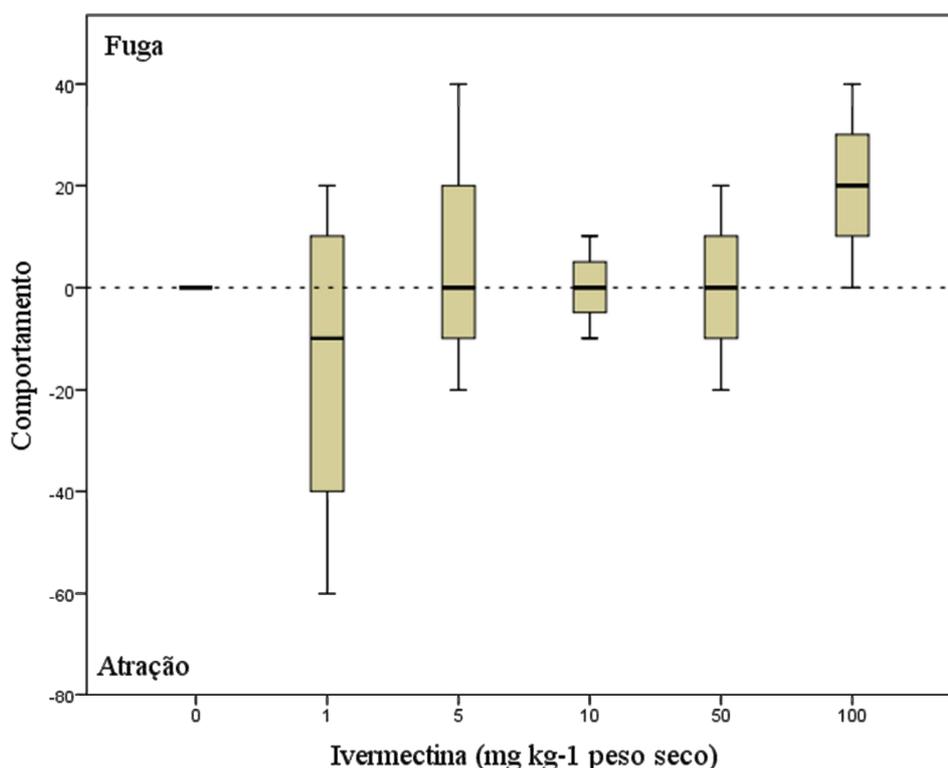


Figura 1: Percentual médio ($n = 4$) do comportamento de fuga de minhocas *Eisenia foetida* em esterco bovino contaminado com diferentes concentrações de ivermectina (mg kg^{-1} massa seca). Barras representam a mediana, variação interquartil e o desvio padrão.

O estudo realizado por Gunn e Sadd (1994), que trabalharam com um produto formulado de ivermectina em solo artificial, demonstrou que as minhocas apresentaram uma resposta de esquia. Eles também destacaram que o produto formulado possui outros ingredientes tóxicos que podem aumentar a resposta dos organismos.

Nunes & Espíndola (2012) também relataram comportamento de fuga em *Eisenia andrei* em solo artificial contaminado com um produto formulado à base de abamectina, porém ao realizarem a mesma avaliação em solo tropical natural, as minhocas não apresentaram um comportamento de evasão. Os autores atribuíram esses resultados às baixas concentrações do pesticida devido às características do solo natural, principalmente pelo alto conteúdo de matéria orgânica.

De certo modo, os resultados encontrados no presente estudo, podem ser explicados pelo uso da ivermectina na forma pura, menos tóxica que os produtos formulados. Além disso, o elevado conteúdo de matéria orgânica (carbono orgânico $465,3 \text{ g kg}^{-1}$ e a relação C/N 41:1) do substrato utilizado pode ter contribuído para a redução da toxicidade desta substância, pois, de acordo com (Halley et al., 1989) a ivermectina adsorve fortemente à matéria orgânica e possui um baixo potencial de dessorção (Krogh et al., 2008)

Embora as minhocas sejam capazes de discriminar solos contaminados, a biodisponibilidade de contaminantes, a afinidade das espécies para solos ricos em matéria orgânica, ou a incapacidade

dos quimiorreceptores em detectar alguns tipos de poluentes podem causar essas diferenças (Sousa et al., 2008). Neste sentido, um teste de fuga conduzido por Piola et al. (2009) não foi eficiente para avaliar efeitos do clorpirifós em *Eisenia andrei*. Desta forma, ainda é um desafio compreender como que as minhocas não podem detectar alguns produtos químicos.

A substituição de testes agudos e crônicos pelo teste de fuga, que tem sido defendida por alguns autores (Hund-Rinke e Wiechering, 2003), também é uma questão a ser discutida. De acordo com de Silva e Van Gestel (2009), a resposta de evasão foi mais sensível do que a sobrevivência e menos sensível do que a reprodução, em testes realizados com clorpirifos e carbofurano para *Eisenia andrei*, indicando que os testes comportamentais só podem ser utilizados em uma triagem preliminar para avaliar a toxicidade de pesticidas para as minhocas.

Conclusões

A resposta de fuga mostrou não ser adequada para determinar a toxicidade de ivermectina em concentrações de até 100 mg kg⁻¹ para *Eisenia foetida* em esterco bovino. Os organismos não responderam à presença da substância química, mesmo com um aumento na concentração do produto. Os resultados obtidos podem contribuir para superar a falta de dados ecotoxicológicos sobre o efeito de lactonas macrocíclicas em condições de vermicompostagem.

Referências

ANTOLÍN, M.C.; PASCUAL, I.; GARCÍA, C.; POLO, A. & SÁNCHEZ-DÍAZ, M. Growth, yield and solute content of barley in soils treated with sewage sludge under semiarid Mediterranean conditions. *Field Crops Research*, 94:224-237, 2005.

BLANCKENHORN W. F., PUNIAMOORTHY N., SCHAFER M. A., SCHEFFCZYK A., RÖMBKE J. Standardized laboratory tests with 21 species of temperate and tropical sepsid flies confirm their suitability as bioassays of pharmaceutical residues (ivermectin) in cattle dung. *Ecotoxicology and Environmental Safety* v. 89, p. 21–28, 2013.

DA SILVA PMCS, VAN GESTEL CAM. Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. *Chemosphere* 77: 1609–1613, 2009.

FERNANDEZ, C., SAN ANDRES, M., PORCEL, M.A., RODRIGUEZ, C., ALONSO, A., TARAZONA, J.V. Pharmacokinetic profile of ivermectin in cattle dung excretion, and its associated environmental hazard. *Soil Sediments Contamination* 18:564–575; 2009.

FLOATE, K, WARDHAUGH K, BOXALL A, SHERRATT T N. Fecal residues of veterinary parasiticides: Nontarget Effects in the Pasture Environment. *Annu. Review of Entomology* v. 50, p.153–79, 2005.

GAO Y., SUN Z., LIU Y., SUN X., LI Y., BAO Y., WANG G. WANG G. Effect of albendazole anthelmintics on the enzyme activities of different tissue regions in *Eisenia fetida*. *European Journal of Soil Biology*, v. 43, p. 246-251, 2007.

GARCIA M, ROMBKE J, DE BRITO MT, SCHEFFCZYK A. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. *Environmental Pollution*, 153:450–456, 2008.

GUNN A, SADD JW. The effect of ivermectin on the survival, behaviour and cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*. *Pedobiologia* v. 38, p. 327–333, 1994.

HALLEY, B.A., JACOB, T.A., LU, A.Y. The environmental impact of the use of ivermectine. *Environmental effects and fate. Chemosphere* 18, 1543-1563; 1989.

HODGE S, WEBSTER KM, BOOTH L, HEPPLETHWAITE V, O'HALLORAN K. Non-avoidance of organophosphate insecticides by the earthworm *Aporrectodea caliginosa* (Lumbricidae). *Soil Biology and Biochemistry*, 32:425–428, 2000.

HORVAT A.J.M., PETROVIC M., BABIC S., PAVLOVIC D.M., ASPERGER D., PELKO S., MANCE A.D., KASTELAN-MACAN M. Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 31, p. 61-84, 2012

HUND-RINKE K, WIECHERING H. Earthworm avoidance test for soil assessment: an alternative for acute and reproduction tests. *Journal of Soils and Sediments*, 1:15–20, 2003.

HUND-RINKE, K.; ACHAZI, R.; ROMBKE, J. & WARNECKE, D. Avoidance test with *Eisenia fetida* as indicator for the habitat function of soils: Results of a laboratory comparison test. *Journal of Soils and Sediments.*, 1:7-12, 2003.

IGLESIAS, L.E., SAUMELL,C.A., FERNANDEZ, A.S., FUSE, L.A., LIFSCHITZ,A.L., RODRIGUEZ, E.M., STEFFAN,P.E., FIEL,C.A. Environmental impact of ivermectin excreted by cattle treated in autumn on dung fauna and degradation of faeces on pasture. *Parasitology Research*, v. 100, p. 93–102, 2006.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2—Determination of effects on reproduction. ISO 11268-2. Geneve, 1998.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Soil quality—avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour. Part 1—Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). ISO 17512-1. Geneve, 2008.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Soil quality—effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*)—Part 1:determination of acute toxicity using soil substrate. ISO 11268-1. Geneve, 1993.

KANEDA, S., YAMASHITA, N., UCHIDA, T., SHIMANO, S., MIYOSHI, N., SASAKI, M., ENAMI, Y. Effects of ivermectin in dung pats on earthworm (Megascolecidae) populations and pat degradation in Japanese grassland. *Applied Soil Ecology* v. 31, p. 280–285, 2006.

KROGH, K.A., JENSEN, G.G., SCHNEIDER, M.K., FENNER, K., HALLING-SORENSEN, B. Analysis of the dissipation kinetics of ivermectin at different temperatures and in four different soils. *Chemosphere* 75, 1097–1104; 2009.

KROGH, K.A., SOEBORG, T., BRODIN, B., HALLING-SORENSEN, B. Sorption and mobility of ivermectin in different soils. *Journal of Environmental Quality*. 37:2202–2211; 2008.

LOUREIRO S, SOARES AMVM, NOGUEIRA JÁ. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. *Environmental Pollution*, 138:121–131, 2005.

LUMARET J. P., ERROUISSI F., FLOATE K., RÖMBKE J., WARDHAUGH K. A Review on the Toxicity and Non-Target Effects of Macrocyclic Lactones in Terrestrial and Aquatic Environments. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 13, p. 1004-1060, 2012.

MARQUES C, PEREIRA R, GONÇALVES F. Using earthworm avoidance behaviour to assess the toxicity of formulated herbicides and their active ingredients on natural soils. *Journal of Soils and Sediments*, 9:137–147, 2009.

MOUGIN, C., KOLLMANN, A., DUBROCA, J., DUCROT, P.H., ALVINERIE, M., GALTIER, P. Fate of the veterinary medicine ivermectin in soil. *Environmental Chemistry Letters*. 1, 131–134; 2003.

NATAL-DA-LUZ T, ROMBKE J, SOUSA JP. Avoidance tests in site specific risk assessment: influence of soil properties on the avoidance response of collembola and earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27:1112–1117, 2008.

NATAL-DA-LUZ, T.; RIBEIRO, R. & SOUSA, J.P. Avoidance tests with collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*., 23:2188-2193, 2004.

NUNES M. E. T., ESPÍNDOLA E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. *Ecotoxicology*, v. 21(4), p.1063-1071, 2012.

OPPEL, J., BROLL, G., LOFFLER, D., MELLER, M., ROMBKE, J., TERNES, T., Leaching behaviour of pharmaceuticals in soil-testing systems: a part of an environmental risk assessment for groundwater protection. *Science and Total Environment*. 328, 265–272; 2004.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline for testing of chemicals n. 207—Earthworm acute toxicity test. Paris, 1984.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline for testing of chemicals n. 222—Earthworm reproduction test. Paris, 2004.

PETERSEN, S.O.; HENRIKSEN, K.; MORTENSEN, G.K.; KROGH, P.H.; BRANDT, K.K.; SØRENSEN, J.; MADSEN, T.; PETERSEN, J. & GRØN, C. Recycling of sewage sludge and household compost to arable land: Fate and effects of organic contaminants, and impact on soil fertility. *Soil Tillage Research*., 72:139-152, 2003.

PIOLA L., FUCHS J., ONETO M.L., BASACK S., GIMÉNEZ R., MASSARO R., PAPA J.C., KESTEN E., CASABÉ N.. Biomarkers for the assessment of chlorpyrifos effects on earthworms

and on soil functional parameters. Pesquisa agropecuária brasileira., Brasília, v.44, n.8, p.874-880, ago. (2009).

REINECKE AJ, MABOETA MS, VERMEULEN LA, REINECKE AS. Assessment of lead nitrate and mancozeb toxicity in earthworms using the avoidance response. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 68:779–786, 2002.

REINECKE SA, REINECKE AJ. The impact of organophosphate pesticides in orchards on earthworms in the Western Cape, South Africa. Ecotoxicology and Environmental Safety, 66:244–251, 2007.

ROMBKE J., KROGH K. A., MOSER T., SCHEFFCZYK A., LIEBIG M. Effects of the Veterinary Pharmaceutical Ivermectin on Soil Invertebrates in Laboratory Tests. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2009.

SCHAEFER M. Behavioural Endpoints in Earthworm Ecotoxicology Evaluation of Different Test Systems in Soil Toxicity Assessment. Journal of Soils and Sediments 3 (2) 79 – 84; 2003.

SHOOP, W.L., MROZIK, H., FISHER, M.H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. Veterinary Parasitology 59, 139-156; 1995.

SOUSA A, PEREIRA R, ANTUNES SC, CACHADA A, PEREIRA E, DUARTE AC, GONÇALVES F. Validation of assays for the screening assessment of soils under different anthropogenic disturbances. Ecotoxicology and Environmental Safety. 71:661–670, 2008.

SUN Y, DIAO X, ZHANG Q, SHEN J. Bioaccumulation and elimination of avermectin B1a in the earthworms (*Eisenia fetida*). Chemosphere v. 60, p. 699–704; 2005.

SVENDSEN, T.S., GRØNVOLD, J., HOLTER, P., SOMMER, C. Field effects of ivermectin and fenbendazole on earthworm populations and the disappearance of dung pats from bolus-treated cattle. Applied Soil Ecology v. 24, p. 207–218; 2003.

TEDESCO, M.J.; BASSANI, C.A.; BOHNEN, H. et al. Análises de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre: Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 174 p., 1995.

TORKHANI AL, ERZEN NK, KOLAR L, CELESETINA TV, LESTAN D. Does ivermectin attract earthworms? Journal of Soils and Sediments 11:124–128. 2011.

WANG, Y., CANG T., ZHAO X., YU R., CHEN L., WU C., WANG Q. Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm, *Eisenia fetida*. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 79, p. 122–128, 2012.

WESTERMAN, P.W. & BICUDO, J.R. Management considerations for organic waste use in agriculture. Bioresearch Technology., 96:215-221, 2005.

YEATES G.W., SKIPP R.A., GRAY R.A.J., CHEN L.-Y., WAGHORN T.S.. Impact on soil fauna of sheep faeces containing a range of parasite control agentes. Applied Soil Ecology, 35: 380–389, 2007.

ZHOU S-P, C-Q DUAN, FU H, CHEN Y-H, WANG X-H, YU Z-F. Toxicity assessment for chlorpyrifos-contaminated soil with three different earthworm test methods. *Journal of Environmental Sciences* 19:854–858; 2007.

9. Conclusões

- Não houve mortalidade das minhocas *Eisenia foetida* mesmo quando expostas a concentrações elevadas de ivermectina durante a vermicompostagem de esterco bovino.
- O desenvolvimento da *Eisenia foetida* é estimulado em concentrações de até 10 mg kg⁻¹ de ivermectina em esterco bovino, diminuindo em concentrações mais elevadas, caracterizando um efeito hormético.
- A capacidade reprodutiva de *Eisenia foetida*, avaliada pela produção de casulos, é prejudicada somente quando as minhocas são expostas à concentração mais elevada de ivermectina.
- Metabolicamente, o estudo revelou que a ivermectina induz efeito hormético sobre as enzimas acetilcolinesterase, catalase e fosfatase alcalina de *Eisenia foetida*, além disso, também pode-se constatar valores diminuídos da enzima glutationa-S-transferase e níveis aumentados de hidroperóxidos durante exposição aguda às doses mais altas da substância testada.
- O teste do comportamento de fuga mostrou não ser adequado para determinar a toxicidade de ivermectina para *Eisenia foetida* em esterco bovino. Os organismos não respondem à presença da substância química, mesmo com um aumento na concentração do produto.
- As condições da atividade microbiana, relacionadas com a evolução de CO₂ e os aspectos químicos do vermicomposto de esterco bovino contaminado experimentalmente com ivermectina, não são alterados durante o período experimental, exceto para os parâmetros Mg e Ca total, que são significativamente elevados.

10. Referências

- AIRA M., DOMÍNGUEZ J. Microbial and nutrient stabilization of two animal manures after the transit through the gut of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). **Journal of Hazardous Materials** 161 (2009) 1234–1238
- AIRA M., MONROY F., DOMÍNGUEZ J. *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) Activates Fungal Growth, Triggering Cellulose Decomposition During Vermicomposting. **Microbial Ecology**, 52: 738–746 (2006a)
- AIRA, M., MONROY, F., DOMÍNGUEZ, J. 2007a. *Eisenia fetida* (Oligochaeta: Lumbricidae) modifies the structure and physiological capabilities of microbial communities improving carbon mineralization during vermicomposting of pig manure. **Microbial Ecology**. 54, 662–671.
- ALVINERIE, M., SUTRA, J.F., GALTIER, P., LIFSCHITZ, A., VIRKEL, G., SALLOVITZ, J., LANUSSE, C. Persistence of ivermectin in plasma and faeces following administration of a sustained-release bolus to cattle. **Research in Veterinary Science**. 66:57–61; 1999.
- ALY M A S AND SCHRÖDER P. Effect of Herbicides on Glutathione S-transferases in the Earthworm, *Eisenia fetida*. **Environmental Science Pollution Research** 15 (2) 143 – 149; 2008.
- ANTONIOLLI Z. I., STEFFEN G.P.K, STEFFEN R. B.. Utilização de casca de arroz e esterco bovino como substrato para a multiplicação de *Eisenia fetida* Savigny (1826). **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 824-830, maio/jun., 2009
- ATIYEH, R.M., ARANCON, N.Q., EDWARDS, C.A., METZGER, J.D., 2001. The influence of earthworm-processed pig manure on the growth and productivity of marigolds. **Bioresource Technology**. 81, 103–108.
- ATIYEH, R.M., J. DOMÍNGUEZ, S. SUBLER, AND C.A. EDWARDS. 2000. Changes in biochemical properties of cow manure during processing by earthworms (*Eisenia andrei*, Bouché) and the effects on seedling growth. **Pedobiologia** 44:709–724.
- BANSAL S., KAPOOR K.K. Vermicomposting of crop residues and cattle dung with *Eisenia foetida*. **Bioresource Technology** 73:95-98; 2000.
- BARTH, D., HEINZE-MUTZ, E.M., LANGHOLFF, W., RONCALLI, R.A., SCHLUTER, D. Colonisation and degradation of dung pats after subcutaneous treatment of cattle with ivermectin or levamisole. **Applied Parasitology** 35, 277–293; 1994.
- BENÍTEZ, E., H. SAINZ, AND R. NOGALES. 2005. Hydrolytic enzyme activities of extracted humic substances during the vermicomposting of a lignocellulosic olive waste. **Bioresource Technology**. 96:785–790.

BENÍTEZ, E., R.NOGALES,C. ELVIRA,G.MASCIANDARO, ANDB.CECCANTI. 1999. Enzyme activities as indicators of the stabilization of sewage sludges composting with *Eisenia foetida*. **Bioresource Technology**. 67:297–303.

BORGERAAS J, NILSEN K, STRENSSEN J. Methods for purification of glutathione transferase in the earthworm genus *Eisenia* and their characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, Pharmacol Toxicol Endocrinol 114 (2) 129–140; 1996.

BOU R., CODONY R., TRES A., DECKER E. A., GUARDIOLA F.. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation–xylenol orange method: A review of the factors that influence the method's performance. **Analytical Biochemistry** 377:1–15; 2008.

BUCKERFIELD, J. C. LEE K. E., DAVOREN C. W., HANNAY J. N. Earthworms as indicators of sustainable Production in dryland cropping in southern Australia. **Soil Biology and Biochemistry** 29,(314) pp. W-554, 1997

CAMPBELL M K, FARRELL S O (2009). **Biochemistry, Sixth Edition**. Thomson Brooks/Cole. Canada, 838p.

CANELLAS, L P.; OLIVARES, F.L.; FAÇANHA, A.L.O.; FAÇANHA, A.R. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**. 130:1951-1957, 2002.

CAPOWIEZ Y., RAULT M., MAZZIA C.,BELZUNCES L.. Earthworm behaviour as a biomarker – a case study using imidacloprid. The 7th international symposium on earthworm ecology · Cardiff · Wales · 2002. **Pedobiologia**, 47:542–547, 2003

CASELLI, F., GASTALDI, L., GAMBI, N., FABBRI, E. In vitro characterization of cholinesterases in the earthworm *Eisenia Andrei*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. C 143, 416–421.; 2006.

DAL-PIZZOL, F., KLAMT, F., VIANNA, M., SCHRODER, N., QUEVEDO, J., BENFATO, M. S., MOREIRA, J. C. F., WALZ, R. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. **Neuroscience Letters** 2000; 291:179-182.

DEMBELE, K., HAUBRUGE, E., GASPER, CH. Recovery of acetylcholine esterase activity in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) after inhibition by organophosphate and carbamate compounds. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 62, 731–742.; 1999.

DENOYELLE,R.,RAULT,M.,MAZZIA,C.,MASCLE,O.,CAPOWIEZ,Y. Cholinesterase activity as a biomarker of pesticide exposure in *Allolobophora chlorotica* earthworms living in apple orchards under different management strategies. **Environmental Toxicology and Chemistry**.26,2644–2649. ,2007.

- DEPLEDGE, M.H., FOSSI, M.C. The role of biomarkers in environmental assessment. 2. Invertebrates. **Ecotoxicology** 3, 161–172.; 1994.
- DIAO X, JENSEN J, HANSEN A D. Toxicity of the anthelmintic abamectin to four species of soil invertebrates. **Environmental Pollution** 148:514-519; 2007.
- DOMÍNGUEZ, J. State of the art and new perspectives on vermicomposting research, in: C.A. Edwards (Ed.), **Earthworm Ecology**, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, 2004, pp. 401–424.
- ELVIRA, C., SAMPEDRO, L., BENITEZ, E., NOGALES, R., 1998. Vermicomposting of sludges from paper-mill and dairy industries with *Eisenia andrei*: a pilot-scale study. **Bioresource Technology**. 63, 205–211.
- FERNANDEZ, C., SAN ANDRES, M., PORCEL, M.A., RODRIGUEZ, C., ALONSO, A., TARAZONA, J.V. Pharmacokinetic profile of ivermectin in cattle dung excretion, and its associated environmental hazard. **Soil Sediments Contamination** 18:564–575; 2009.
- FLOATE KD. Off-target effects of ivermectin on insects and on dung degradation in southern Alberta, Canada. **Bulletin of Entomology Research** 88:25–35; 1998.
- FLOATE, K, WARDHAUGH K, BOXALL A, SHERRATT T N. Fecal residues of veterinary parasiticides: Nontarget Effects in the Pasture Environment. **Annu. Review of Entomology**. 2005. 50:153–79
- FORRESTER, S.G., PRICHARD, R.K., DENT, J.A., BEECH, R.N. *Haemonchus contortus*: HcGluCla expressed in *Xenopus* oocytes forms a glutamate-gated ion channel that is activated by ibotenate and the antiparasitic drug ivermectin. **Molecular and Biochemistry Parasitology**. 129, 115–121. 2003.
- GAETE H., HIDALGO M. E. NEAMAN A.; ÁVILA G. Evaluación de la toxicidad de cobre en suelos a través de biomarcadores de estrés oxidativo en *Eisenia foetida*. **Quimica Nova**, Vol. 33, No. 3, 566-570, 2010.
- GAMBI, N., PASTERIS, A., FABBRI, E. Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology**. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 145, 678–685.; 2007.
- GAO Y., SUN Z., LIU Y., SUN X., LI Y., BAO Y., WANG G. WANG G. Effect of albendazole anthelmintics on the enzyme activities of different tissue regions in *Eisenia fetida*. **European Journal of Soil Biology** 43:S246-S251, 2007.
- GAO Y., SUN Z., SUN X., SUN Y., SHI W. Toxic effects of albendazole on adenosine triphosphatase activity and ultrastructure in *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 67: 378–384, 2007.

GARCIA M, RÖMBKE J, DE BRITO MT, SCHEFFCZYK A. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. **Environmental Pollution** 153(2):450–456; 2008.

GARG. CHAND – A. CHHILLAR –A. YADAV. Growth and reproduction of *eisenia foetida* In various animal wastes during vermicomposting. **Applied Ecology and Environmental Research** 3(2): 51-59; 2005.

GARG, V.K.; GUPTA, R. (2009). Vermicomposting of agro-industrial processing waste. Chapter 24. *In*: POONAM SINGH NEE'NIGAM, ASHOK PANDEY. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation Utilisation of Agro-Residues**. Springer Science+Business Media B.V; 462p.

GAY C. A., GEBICKI J.M. Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric–xylenol orange method. **Analytical Biochemistry** 315 29–35; 2003.

GAY C., COLLINS J., GEBICKI J.M. Hydroperoxide Assay with the Ferric-Xylenol Orange Complex. **Analytical Biochemistry** 273, 149–155; 1999.

GORRES, J.H., SAVIN, M.C., AMADOR, J.A. Soil micropore structure and carbon mineralization in burrows and casts of an anecic earthworm (*Lumbricus terrestris*). **Soil Biology and Biochemistry** 33, 1881–1887, 2001.

GRØNVOLD J., SVENDSEN T. S., KRAGLUND H. O, BRESCIANI J, MONRAD J. Effect of the antiparasitic drugs fenbendazole and ivermectin on the soil nematode *Pristionchus maupasi*. **Veterinary Parasitology** 124:91–99; 2004.

GUNADI B., EDWARDS C.A., BLOUNT C. The influence of different moisture levels on the growth, fecundity and survival of *Eisenia fetida* (Savigny) in cattle and pig manure solids. **European Journal of Soil Biology** 39:19–24; 2003.

GUNN A, SADD JW. The effect of ivermectin on the survival, behaviour and cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*. **Pedobiologia** 38:327–333; 1994.

HACKENBERGER A B K, JARIC-PERKUSIC, STEPIC S. Effect of temephos on cholinesterase activity in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety** 71:583–589; 2008.

HALLEY, B.A., JACOB, T.A., LU, A.Y. The environmental impact of the use of ivermectine. Environmental effects and fate. **Chemosphere** 18, 1543-1563; 1989.

HARITHA DEVI S., K. VIJAYALAKSHMI, K. PAVANA JYOTSNA, S.K. SHAHEEN, K. JYOTHI AND M.SUREKHA RANI. Comparative assessment in enzyme activities and microbial populations during normal and vermicomposting. **Journal of Environmental Biology**. 30(6) 1013-1017 (2009)

HELLING, S.A. REINECKE, A.J. REINECKE, Effects of the fungicide copper oxychloride on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta), **Ecotoxicology and Environmental Safety** 46:108-116.; 2000.

HERD R. Endectocidal drugs: Ecological Risks and Counter-Measures. **International Journal for Parasitology** (25)8: 875-885, 1995.

HERD R., STRONG L., WARDHAUGH K. Environmental Impact of Avermectin Usage in Livestock (Special issue). **Veterinary Parasitology** 48: 1-344; 1993.

HERD, R., SAMS, R.A., ASHCRAFT, S.M., Persistence of ivermectin in plasma and faeces following treatment of cows with ivermectin sustained-release, pour-on or injectable formulations. **International Journal for Parasitology** 26, 1087–1093; 1996.

HERMES-LIMA M., STOREY J. M. AND STOREY K B.. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. In: **Protein Adaptations and Signal Transduction**. Edited by K.B. Storey and J.M. Storey Elsevier Science B. V. Chapter 20. 2001

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. **Free Radical Biology & Medicine**, 19: 271-280, 1995.

HOLTER, P., SOMMER, C., GRONVOLD, J., MADSEN, M. Effects of ivermectin treatment on the attraction of dung beetles (Coleoptera, Scarabaeidae and Hydrophilidae) to cow pats. **Bulletin Entomology Research**. 83:53–58; 1993.

HONG S. H., LEE J S, CHUNG K S. Effect of enzyme producing microorganisms on the biomass of epigeic earthworms (*Eisenia fetida*) in vermicompost. **Bioresource Technology** 102 (2011) 6344–6347

HUND-RINKE K, WIECHERING H. Earthworm avoidance test for soil assessments—an alternative for acute and reproduction tests. **Journal of Soil Sediments** 1(1):15–20; 2001.

IGLESIAS L E.; FUSÉ L A; LIFSCHITZ A. L.; RODRÍGUEZ E. M.; SAGÜÉS M F; SAUMELL C. A. Environmental monitoring of ivermectin excreted in spring climatic conditions by treated cattle on dung fauna and degradation of faeces on pasture. **Parasitology Research** (2011) 108:1185–1191

IGLESIAS, L.E., SAUMELL,C.A., FERNANDEZ, A.S., FUSE, L.A., LIFSCHITZ,A.L., RODRIGUEZ, E.M., STEFFAN,P.E., FIEL,C.A. Environmental impact of ivermectin excreted by cattle treated in autumn on dung fauna and degradation of faeces on pasture. **Parasitology Research**.100,93–102. 2006.

JENSEN, J., KROGH,P.H., SVERDRUP,L.E. Effects of the antibacterial agents tiamulin, olanquinox and metronidazole and the anthelmintic ivermectin on the soil invertebrate species *Folsomia fimetaria* (Collembola) and *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae).**Chemosphere** 50,437–443. 2003.

JIANG Z-Y, HUNT JV, WOLFF SP. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry** 202: 384–38; 1992.

JIANG Z-Y, WOOLLARD ACS, WOLFF SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange—Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids** 26:853–856; 1991.

KANEDA , N. YAMASHITA, T. UCHIDA , S. SHIMANO, N. MIYOSHI, M. SASAKI, Y. ENAMI. Effects of ivermectin in dung pats on earthworm (Megascolecidae) populations and pat degradation in Japanese grassland. **Applied Soil Ecology** 31:280–285; 2006.

KOLAR L., FLAJS V. C., KUZNER J., MARC I, POGACNIK M, BIDOVEC A, VAN GESTEL C A.M., ERZEN, N. K. Time profile of abamectin and doramectin excretion and degradation in sheep faeces. **Environmental Pollution** 144:197-202; 2006.

KOLAR L., NEVENKA KOZUH ERZEN, LENNY HOGERWERF , CORNELIS A.M. VAN GESTEL. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. **Environmental Pollution** 151:182 – 189; 2008.

KOSCHORRECK, J., KOCH, C., RONNEFAHRT, I., Environmental risk assessment of veterinary medicinal products in the EU—a regulatory perspective. **Toxicology Letters** 131, 117–124; 2002.

KOTZERKE A., KLEMER S., KLEINEIDAM K., HORN M. DRAKE H. L., SCHLOTTER M., WILKE B M. Manure contaminated with the antibiotic sulfadiazine impairs the abundance of nirK- and nirS-type denitrifiers in the gut of the earthworm *Eisenia fetida*. **Biology and Fertility of Soils** (2010) 46:415–418

KROGH, K.A., JENSEN, G.G., SCHNEIDER, M.K., FENNER, K., HALLING-SORENSEN, B. Analysis of the dissipation kinetics of ivermectin at different temperatures and in four different soils. **Chemosphere** 75, 1097–1104; 2009.

KROGH, K.A., SOEBORG, T., BRODIN, B., HALLING-SORENSEN, B. Sorption and mobility of ivermectin in different soils. **Journal of Environmental Quality**. 37:2202–2211; 2008.

KRYGER U., DESCHODT, C., SCHOLTZ C.H. Effects of fluazuron and ivermectin treatment of cattle on the structure of dung beetle communities. **Agriculture, Ecosystems and Environment** 105:649–656, 2005.

LACOURSE E J, HERNANDEZ-VADEL M, JEFFERIES J R, SVENDSEN C, SPURGEON D J., BARRETT J., MORGAN A J, KILLE P, BROPHY P M. Glutathione transferase (GST) as a candidate molecular-based biomarker for soil toxin exposure in the earthworm *Lumbricus rubellus*. **Environmental Pollution** 157 2459–2469; 2009.

LANDGRAF, M.D.; ALVES, M.R.; DA SILVA, S.C.; REZENDE, M.O.D. Characterization of humic acids from vermicompost of cattle manure composting by 3 and 6 months. **Química Nova**, 22:483-486, 1999.

LOH T.C., LEE Y.C., LIANG J.B., TAN D. Vermicomposting of cattle and goat manures by *Eisenia foetida* and their growth and reproduction performance. **Bioresource Technology** 96: 11–114; 2005.

LORES, M., GÓMEZ-BRANDÓN, M., PÉREZ, D., DOMÍNGUEZ, J., 2006. Using FAME profiles for the characterization of animal wastes and vermicomposts. **Soil Biology and Biochemistry**. 38, 2993–2996.

LOWE C. N, BUTT N. R.. Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: A critical review. **European Journal of Soil Biology** 43: S281-S288; 2007.

LUKKARI T., M. TAAVITSAINEN, M. SOIMASUO, A. OIKARI, J. HAIMI. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier metal exposure. **Environmental Pollution** 129: 377-386; 2004.

LUKKARI, M. AATSINKI, A. VAISANEN, J. HAIMI, Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworm tests. **Applied Soil Ecology**. 30 133-146; 2005.

LUMARET, J.P., ERROUISSI, F. Use of anthelmintics in herbivores and evaluation of risks for the non target fauna of pastures. **Veterinary Research** 33, 547-562; 2002.

LUO Y R, WANG S H, YUN M X, LI X Y, WANGE, J J, SUN Z J. The toxic effects of ionic liquids on the activities of acetylcholinesterase and cellulase in earthworms. **Chemosphere** 77:313–318; 2009.

MADSEN, M., NIELSEN, B.O., HOLTER, P., PEDERSEN, O.C., JESPERSEN, J.B., JENSEN, K.M.V., NANSEN, P., GRØNVOLD, J. Treating cattle with ivermectin: Effects on the fauna and decomposition of dung pats. **Journal of Applied Ecology** 27:1–15; 1990.

MARQUES C, PEREIRA R, GONÇALVES F. Using earthworm avoidance behaviour to assess the toxicity of formulated herbicides and their active ingredients on natural soils. *Journal of Soils and Sediments*, 9:137–147, 2009.

MASCIANDARO, G.; CECCANTI, B. & GARCIA, C. Soil agroecological management: fertirrigation and vermicompost treatments. **Bioresource Technology**. 59:199-206, 1999.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (2010). Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2010/07/brasil-e-estados-unidos-discutem-retomada-das-exportacoes-de-carne>>. Acesso em 13/02/2014

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (2011). Instrução Normativa SDA N.º 48, de 28 de dezembro de 2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>> - Acesso em: 05/02/2014.

MONSERRAT, J M.; GERATACIANO, L A.; PINHO, G L. L. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylenol orange complex formation. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. New York, v. 45, n. 2, p.177-183, aug., 2003.

MORSELLI, T.B.G.A. **Minhocultura**. Editora UFPEL-Pelotas RS. 114p. 2009.(a)

MORSELLI, T.B.G.A. **Resíduos Orgânicos em Sistemas Agrícolas**. Editora UFPEL-Pelotas RS. 228p. 2009.(b)

MOUGIN, C., KOLLMANN, A., DUBROCA, J., DUCROT, P.H., ALVINERIE, M., GALTIER, P. Fate of the veterinary medicine ivermectin in soil. **Environmental Chemistry Letters**. 1, 131–134; 2003.

MUSCOLO, A.; BOVALO, F.; GIONFRIDDO, F.; NARDI, S. Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. **Soil Biology and Biochemistry**. 31:1303-1311, 1999.

MUGALE M. N., NAIR D., CHAUHAN V.S., SACHDEVA M., GATNE M.M. Preliminary observations on the vermicompost made from Faecal Pellets of Ivermectin treated goats. **International journal of environmental sciences** Vol. 3, N° 5: 1355-1361, 2013.

NATAL-DA-LUZ T, RIBEIRO R, SOUSA JP. Avoidance tests with Collembola and earthworms as early screening tools for sitespecific assessment of polluted soils. **Environmental Toxicology and Chemistry** 23 (9):2188–2193; 2004.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, V. 1, N. 2, 1-18(18) Test No. 222: April 1984. Adopted (2004).

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development, Test 207: earthworm, acute toxicity tests. In: **Organization for Economic Co-operation and Development** (Ed.), OECD Guidelines for testing of chemicals. 1984.

OMURA, S., CRUMP, A., The life and times of ivermectin—a success story. **Nat. Review Microbiology**. 2, 984–989; 2004.

OMURA, S., Ivermectin: 25 years and still going strong. **International Journal Antimicrob. Agents** 31, 91–98; 2008.

OPPEL, J., BROLL, G., LOFFLER, D., MELLER, M., ROMBKE, J., TERNES, T., Leaching behaviour of pharmaceuticals in soil-testing systems: a part of an

environmental risk assessment for groundwater protection. **Science and Total Environment**. 328, 265–272; 2004.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (2013). Relatório - Perspectivas da População Mundial: Revisão de 2012. Disponível em: <<http://www.onu.org.br/populacao-mundial-deve-atingir-96-bilhoes-em-2050-diz-novo-relatorio-da-onu/>> Acesso em: 05/02/2014.

PARK S C, KOH K S, PARK H W (1998). Molecular weights and inhibitor sensitivities of alkaline phosphatase isoenzymes from the midgut of the earthworm, *Eisenia andrei*. **Soil Biology and Biochemistry**. Vol. 30, No. 6, 831-832.

PARK S C, PARK H W and SMITH T J (1996). Expression of alkaline phosphatases during embryonic development and immature stages of the earthworm, *Eisenia andrei*. **Soil Biology and Biochemistry**. Vol. 28, No. 4/S, 579-582.

PRABHA, L M; JAYARAAJ I A; JEYARAAJ R; SRINIVASA R. Comparative studies on the digestive enzymes in the gut of earthworms, *Eudrilus eugenia* and *Eisenia foetida*. **Indian Journal of Biotechnology**. 6:567-569; 2007.

PRAMANIK P; CHUNG Y.R. (2010). Efficacy of vermicomposting for recycling organic portion of hospital wastes using *Eisenia fetida*: standardization of cow manure proportion to increase enzymatic activities and fungal biomass. **Environmentalist** 30:267–272

RAVINDRAN B., DINESH S.L., KENNEDY L. J., SEKARAN G. (2008). Vermicomposting of Solid Waste Generated from Leather Industries Using Epigeic Earthworm *Eisenia foetida*. **Applied Biochem Biotechnol**; 151:480–488.

RAO, J.V., KAVITHA, P. Toxicity of azodrin on the morphology and acetylcholinesterase activity of the earthworm *Eisenia foetida*. **Environmental Research**. 96:323–327. , 2004.

RAO, J.V., PAVAN, Y.S., MADHAVENDRA, S.S. Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, *Eisenia foetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 54, 296–301.; 2003.

RAULT M, MAZZIA C, CAPOWIEZ Y. Tissue distribution and characterization of cholinesterase activity in six earthworm species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 147:340–346; 2007.

REDDY N C, RAO J V. Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 71: 574–582; 2008.

REINECKE, S.A., REINECKE, A.J. Biomarker response and biomass change of earth- worms exposed to chlorpyrifos in microcosms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 66, 92–101.; 2007.

RIBERA, D., NARBONNE, J.F., ARNAUD, C., SAINT-DENIS, M. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. **Soil Biology and Biochemistry** 33:1123–1130; 2001.

RÖMBKE, J., COORS A, FERNÁNDEZ A A, FÖRSTER B, FERNÁNDEZ C, JENSEN J, LUMARETE J, COTS M A P, LIEBIG M. Effects of the parasiticide ivermectin on the structure and function of dung and soil invertebrate communities in the field (Madrid, Spain). **Applied Soil Ecology** 45 (2010) 284–292

ROMBKE J., KROGH K. A., MOSER T., SCHEFFCZYK A., LIEBIG M. Effects of the Veterinary Pharmaceutical Ivermectin on Soil Invertebrates in Laboratory Tests. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 2009

SAINT-DENIS M, LABROT F, NARBONNE JF, RIBERA D. Glutathione, glutathione related enzymes and catalase activities in the earthworms *Eisenia fetida andrei*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 35, 602–614; 1998.

SCAPS P, GRELE C, DESCAMPS M. Cadmium and Lead Accumulation in the Earthworm *Eisenia fetida* (Savigny) and its Impact on Cholinesterase and Metabolic Pathway Enzyme Activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 116C, No. 3, pp. 233–238, 1997

SCHAEFER M. Behavioural Endpoints in Earthworm Ecotoxicology Evaluation of Different Test Systems in Soil Toxicity Assessment. **Journal of Soils and Sediments** 3 (2) 79 – 84; 2003.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. W.; DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **The Biochemical Journal**. V. 360, p. 1 – 16. 2001.

SHOOP, W.L., MROZIK, H., FISHER, M.H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Veterinary Parasitology** 59, 139-156; 1995.

SINGH J., KAUR A., VIG A.P., RUP, P.J. (2010). Role of *Eisenia fetida* in rapid recycling of nutrients from biosludge of beverage industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 73: 430–435

SOMMER C, BIBBY B.M. The influence of veterinary medicines on the decomposition of dung organic matter in soil. **European Journal of Soil Biology** 38: 155–159; 2002.

SOMMER C.; STEFFANSEN B. Changes with time after treatment in the concentrations of ivermectin in fresh cow dung and in cow pats aged in the field. **Veterinary Parasitology** 48: 67-73; 1993.

SOMMER, C., STEFFANSEN, B., NIELSEN, B.O., JENSEN, V., JESPERSEN, K.M.V., SPRINGBORG, J.B., NANSEN, P. Ivermectin excreted in cattle dung after subcutaneous injection or pouron treatment—concentrations and impact on dung fauna. **Bulletin of Entomology Research**. 82:257–264; 1992.

SONG Y., ZHU L.S., WANG J., WANG J.H., LIU W., XIE H. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. **Soil Biology and Biochemistry** 41:905–909; 2009.

STRONG, L., JAMES, S. Some effects of ivermectin on the yellow dung fly, *Scatophaga stercoraria*. **Veterinary Parasitology** 48:181-191; 1993.

SUÁREZ VH, LIFSCHITZ, AL, SALLOVITZ JM, LANUSSE CE. Effects of ivermectin and doramectin faecal residues on the invertebrate colonization of cattle dung. **Journal of Applied Entomology** 127:481–488; 2003.

SUAREZ, V.H. Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. **Veterinary Research** 33:563-573; 2002.

SVENDSEN, T.S., GRØNVOLD, J., HOLTER, P., SOMMER, C. Field effects of ivermectin and fenbendazole on earthworm populations and the disappearance of dung pats from bolus-treated cattle. **Applied Soil Ecology** 24:207–218; 2003.

UEDA M, ASANO T, NAKAZAWA M, KIYATAKE M, INOUE K (2008). Purification and characterization of novel raw-starch-digesting and cold-adapted α -amylases from *Eisenia foetida*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 150 (2008) 125–130

VALENTE, B.; MORSELLI, T.B.G.A. Variação populacional de *Eisenia foetida* em diferentes misturas de resíduos orgânicos oriundos da propriedade rural. In: **Congresso da Pós-Graduação em Ciências Agrárias**, 1, 1996, Pelotas. Resumos... Pelotas: UFPel,. v.1, p.105.; 1996.

WALL R, STRONG L. Environmental consequences of treating cattle with the antiparasitic drug ivermectin. **Nature** 327:418–421; 1987.

WHALEN J K; PARMELEE R W; SUBLER S (2000). Quantification of nitrogen excretion rates for three lumbricid earthworms using ^{15}N . **Biology and Fertility of Soils** 32:347–352

WRATTEN, S.D., MEAD-BRIGGS, M., GETTINBY, G., ERICSSON, G., BAGGOTT, D.G. An evaluation of the potential effects of ivermectin on the decomposition of cattle dung pats. **Veterinary Record**. 133, 365–371; 1993.

YADAV A., GARG V.K. (2011). Recycling of organic wastes by employing *Eisenia fetida*. **Bioresource Technology** 102 2874–2880

YASMIN S; D'SOUZA D. Effect of Pesticides on the Reproductive Output of *Eisenia fétida*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 79:529–532; 2007.

XUE Y, GU X, WANG X, SUN C, XU X, SUN J, ZHANG B (2009). The hydroxyl radical generation and oxidative stress for the earthworm *Eisenia fetida* exposed to tetrabromobisphenol A. **Ecotoxicology**. Aug;18(6):693-9.

ZHAO L., WANG, YANG J., XING M., LI X., YI D., DENG D. Earthworm–microorganism interactions: A strategy to stabilize domestic wastewater sludge. **Water Research** 44 (2010) 2572 – 2582

ZHOU S-P, C-Q DUAN, FU H, CHEN Y-H, WANG X-H, YU Z-F. Toxicity assessment for chlorpyrifos-contaminated soil with three different earthworm test methods. **Journal of Environmental Sciences** 19:854–858; 2007.

ZWART L. L, MEERMAN J.H.N., COMMANDEUR J.N.M., VERMEULEN N.P.E. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 26, Nos. 1/2, pp. 202–226, 1999