



AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE IVERMECTINA EM SOLO UTILIZANDO *Enchytraeus crypticus*

Palavras-chave: ECOTOXICOLOGIA; BIOINDICADORES; FÁRMACOS.

Autoras:

MARIA GABRIÉLA CAXIAS RIBEIRO, FT-UNICAMP

Profa. Dra. CASSIANA MARIA REGANHAN CONEGLIAN (orientadora), FT-UNICAMP

INTRODUÇÃO

Devido à grande demanda por alimentos, nos últimos anos intensificou-se a utilização de tecnologias e métodos para o tratamento dos animais de criação, devido a inúmeras doenças que podem acometê-los. Para garantir a saúde dos rebanhos são aplicados de forma preventiva vários fármacos veterinários a fim de reduzir os riscos e as doenças e infecções. A ivermectina tem sido amplamente utilizada no controle e tratamento de parasitas em criações de bovinos, suínos, ovinos e equinos (LAVADOURO *et al.*, 2013).

Segundo a Base de Dados de Substâncias Veterinárias, da Universidade de Herfordshire, a ivermectina é uma substância de alta toxicidade (classe III) e possui uma degradação (DT_{50}) típica em solo de 112 dias, com variação na literatura entre 7 e 240 dias, tratando-se então, de uma substância persistente, além de ser também uma substância com alta mobilidade em solo, já que possui um K_{oc} de 14.150 (VSDB, 2021). Essas características indicam que a utilização de ivermectina no tratamento veterinário é uma problemática quando considerada sua

disposição em solo, liberada junto às fezes e demais excrementos após sua administração nos animais em tratamento (MOLENTO, 2021).

O solo atua como habitat para diversos organismos e efetua serviços ecossistêmicos que podem ser afetados por contaminantes depositados, desse modo, é importante avaliar esses efeitos com testes de toxicidade (NOVAIS *et al.*, 2014).

Para para quantificar e qualificar a toxicidade de substâncias no solo, são utilizados organismos-teste, tais como o *Enchytraeus crypticus*, anelídeos majoritariamente terrestres da mesofauna do solo (classe Oligochaeta, família Enchytraeidae) e têm papel importante na decomposição da matéria orgânica do solo (DIDDEN *et al.*, 1993).

Os *E. crypticus* geralmente são incolores, com pele lisa e úmida e tamanho de 2 a 40 mm (Figuras 1 e 2), possuem um cinturão glandular em forma de anel na cor branca chamado de clitelo (clitellum). Considerados organismos tipicamente florestais, influenciam na estrutura do solo e são de extrema importância na cadeia alimentar (RÖMBKE *et al.*, 2017).

Como vivem em contato direto com a fração porosa do solo, estão em constante exposição dermal, intestinal e respiratória a compostos presentes no solo (CASTRO-FERREIRA *et al.*, 2012). Por conta disso, é uma espécie muito comum na ecotoxicologia do solo, utilizada como organismo-teste para avaliar a sobrevivência, a reprodução e a bioacumulação, além de traços comportamentais como evasão, embriotoxicidade, eclosão, crescimento e estado de maturidade (GONÇALVES *et al.*, 2016).

Desta forma, torna-se necessário analisar o efeito de fármacos de uso veterinário para organismos não-alvo da microbiota do solo, visto que estão em contato direto

JUSTIFICATIVA

Inicialmente, este trabalho teve como finalidade avaliar a toxicidade crônica do antiparasitário de uso veterinário ivermectina para organismos da espécie *Enchytraeus crypticus* e verificar a reprodução deste quando situado em solo artificial tropical e em solo natural. No entanto, ao decorrer do desenvolvimento, foram realizados testes adicionais a fim de enriquecer os dados para avaliação dos efeitos ecotoxicológicos da ivermectina como conteúdo para elaboração do Trabalho de Conclusão de Curso, aprovado em 26 de julho de 2023, o qual foi iniciado a fim de aprofundar o projeto desta Iniciação Científica. Portanto, o teste com *Enchytraeus crypticus* exposto a ivermectina em solo natural foi adiado para início na primeira semana de agosto. Assim, este resumo conta apenas com os dados e informações do teste realizado para este trabalho e algumas observações dos testes realizados para o TCC da autora.

METODOLOGIA

Foram realizados testes de toxicidade com o fármaco de uso veterinário de nome comercial IVOMEK, à base de ivermectina a 1%, comumente aplicado na agropecuária no combate a parasitas internos e externos em suínos, ovinos e bovinos.

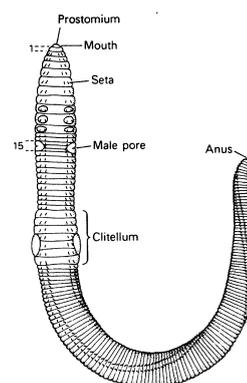


Figura 2 - ilustração *Enchytraeus crypticus* - fonte: NEMAPLEX, 2018

Para avaliar os efeitos em organismos não alvo pertencentes à mesofauna, foi utilizada a espécie *Enchytraeus crypticus* (Figura 1) da classe Oligochaeta, família Enchytraeidae, cultivados pelo LAECOS-FT em estufa a 20 ± 2 °C com fotoperíodo de 16h/8h (claro/escuro) e alimentados 2 vezes na semana com farinha de aveia e a umidade do meio corrigida com água destilada. O contaminante foi aplicado em solo artificial tropical (SAT), preparado seguindo o protocolo da Norma ABNT - NBR 15537 (2014), adaptação do solo artificial da OECD (OECD, 2013), composto por 150g de areia, 10g de fibra de coco e 40g de caulim. Os organismos foram expostos a ivermectina nas concentrações de 0,2mg/kg_{soloseco}, 0,4mg/kg_{soloseco}, 1,6mg/kg_{soloseco}, 3,2mg/kg_{soloseco}, 6,4mg/kg_{soloseco}. O teste foi realizado em frascos de vidro contendo 30g de SAT previamente contaminado com as concentrações de interesse, e 10 indivíduos adultos clitelados de

Enchytraeus crypticus, mantidos em estufa BOD a 20 ± 2 °C com fotoperíodo de 16h/8h por 21 dias, com manutenção a cada 7 dias (ISO, 2014). Para o controle foram feitas 6 replicatas e para cada concentração de interesse foram feitas 5 replicatas. Ao final do teste, foi feita a quantificação dos organismos e verificação da reprodução durante o período testado.

Testes adicionais para aprofundamento

Para avaliar os efeitos da ivermectina na respiração de fungos e bactérias heterotróficas, responsáveis pela decomposição da matéria orgânica no solo, foi utilizado o método respirométrico de Bartha e Pramer. O contaminante foi aplicado em solo natural coletado no CRHEA, USP São Carlos, pela equipe do LAECOS-FT. O teste foi realizado em respirômetros, contendo 50g de solo natural com umidade residual previamente identificada, sendo 3 replicatas para o controle e as concentrações de 0,2mg/kg_{soloseco} e 10,0mg/kg_{soloseco}, na ausência e na presença de aditivo biológico Microgeo da Microbiol Indústria e comércio LTDA, composto por 5% de produto orgânico comercial, 20% de esterco bovino e 75% de água, contendo 300 grupos de microrganismos, sendo 89% de bactérias, e o restante fungos e leveduras. Os frascos foram incubados em estufa BOD a 28 ± 2 °C, durante o período de 25 dias, com manutenção do KOH para titulação com HCl em intervalos crescentes. Ao final, foi feito o cálculo da massa de CO₂ acumulado. Em simultâneo foi feita a quantificação de microrganismos presentes no solo ao início e ao final do teste de respirometria de Bartha e Pramer, pela técnica de semeadura em placa *Pour plate* em meio PCA para bactérias heterotróficas e meio

Sabouraud para fungos, realizado em duplicatas para cada diluição (10^{-1} a 10^{-12}), pares para as bactérias e ímpares para os fungos.

Para avaliar os efeitos fitotóxicos da ivermectina, foram utilizadas sementes de *Eruca sativa* (alface) e *Lactuca sativa* (rúcula), com teste de germinação de sementes. O contaminante foi aplicado em placas de petri contendo papel filtro com diâmetro de 90mm, em 3 replicatas por concentração de interesse, adicionando 20 sementes de uma espécie por placa. As sementes foram expostas ao controle e as concentrações de ivermectina em 0,2mg/kg_{soloseco}, 3,2mg/kg_{soloseco} e 10mg/kg_{soloseco}. As placas foram armazenadas em local escuro a 22 ± 2 °C por 5 dias. Ao final, as sementes germinadas foram medidas utilizando uma régua.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados obtidos nas contagens foram aplicados em análise estatística no software Paleontological Statistical 4.03 (Past4).

Figura 2 - Reprodução de *E. crypticus* no controle - fonte: autoria própria

Ivermectina (mg/kg solo seco)	Replicatas	n° Organismos	Média	
Controle	0	A	958	840
		B	885	
		C	747	
		D	786	
		E	834	
		F	834	
		G	856	

Figura 3 - Reprodução de *E. crypticus* exposto a 0,2mg/kg_{soloseco} de ivermectina - fonte: autoria própria

Ivermectina (mg/kg solo seco)	Replicatas	n° Organismos	Média	
C1	0,2	A	814	727
		B	728	
		C	687	
		D	712	
		E	698	

Figura 4 - Reprodução de *E. crypticus* exposto a 0,4mg/kg_{soloseco} de ivermectina - fonte: autoria própria

	Ivermectina (mg/kg solo seco)	Replicatas	n° Organismos	Média
C2	0,4	A	515	562
		B	531	
		C	683	
		D	556	
		E	527	

Figura 5 - Reprodução de *E. crypticus* exposto a 1,6mg/kg_{soloseco} de ivermectina - fonte: autoria própria

	Ivermectina (mg/kg solo seco)	Replicatas	n° Organismos	Média
C3	1,6	A	223	176
		B	169	
		C	304	
		D	89	
		E	95	

Figura 6 - Reprodução de *E. crypticus* exposto a 3,2mg/kg_{soloseco} de ivermectina - fonte: autoria própria

	Ivermectina (mg/kg solo seco)	Replicatas	n° Organismos	Média
C4	3,2	A	102	84
		B	77	
		C	86	
		D	66	
		E	89	

Figura 7 - Reprodução de *E. crypticus* exposto a 6,4mg/kg_{soloseco} de ivermectina - fonte: autoria própria

	Ivermectina (mg/kg solo seco)	Replicatas	n° Organismos	Média
C5	6,4	A	34	30
		B	21	
		C	22	
		D	49	
		E	24	

Figura 8 - Normalidade Lilliefors L - fonte: autoria própria.

	CT	C1	C2	C3	C4	C5
p	1	0,1542	0,06159	0,6337	1	0,1687

Legenda: CT(controle)=0,0 mg/kg; C1=0,2 mg/kg; C2=0,4 mg/kg; C3=1,6 mg/kg; C4 = 3,2 mg/kg; C5 = 6,4 mg/kg

Figura 9 - Desvio padrão e média de reprodução de *Enchytraeus crypticus* - fonte: autoria própria

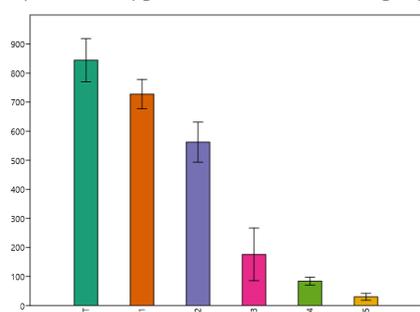
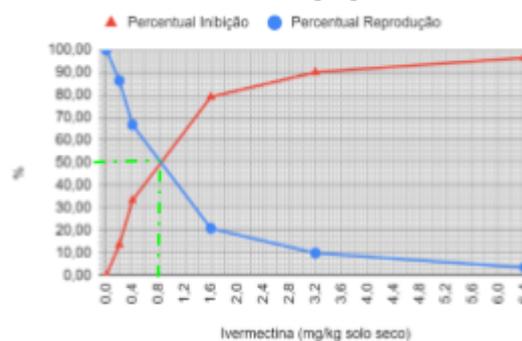


Figura 10 - Percentual de reprodução e de inibição - fonte: autoria própria



Como ilustrado na Figura 11, a população de *E. crypticus* presentes nos frascos após realização dos testes apresentou-se decrescente à medida em que a concentração de ivermectina aumentou. Como ilustrado na Figura 12, as concentrações de efeito não observado (NOAEL) e de menor efeito observado (LOAEL) foram as duas menores aplicadas no teste (0,2 e 0,4mg/kg_{soloseco}), respectivamente, e o CE50 foi de 0,8mg/kg_{soloseco}.

CONCLUSÕES

Embora não tenha apresentado letalidade para o *Enchytraeus crypticus*, nas concentrações e condições testadas neste trabalho, a contaminação do solo por ivermectina apresenta potencial perigo para a espécie, pois a redução da presença desses organismos no solo pode ser prejudicar a efetividade dos serviços ecossistêmicos dos solos, tendo em vista que é uma espécie de importância ecológica na estrutura do solo e na cadeia alimentar da biota do solo. Portanto, torna-se necessária a adequação regulamentada da ivermectina excretada pelos animais na agropecuária e aplicada como esterco na agricultura, a fim de proteger esses e outros organismos não alvo que são afetados negativamente pela exposição.

BIBLIOGRAFIA

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15537 - Ecotoxicologia terrestre - Toxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas (Lumbricidae). 2014.

CASTRO-FERREIRA, M. P.; ROELOFS, D.; VAN GESTEL, C. A. M.; VERWEIJ, R. A.; SOARES, A. M. V. M.; AMORIM, M. J. B. *Enchytraeus crypticus* as a model species in soil ecotoxicology. **Chemosphere**. v. 87, e. 11, p. 1222-1227, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.021>>. Acesso em: 09 mai 2022.

DIDDEN, W. A. M. **Ecology of terrestrial Enchytraeidae**. *Pedobiologia* 37: 2-29, 1993.

GONÇALVES, M. F. M.; GOMES, S. I. L.; SOARES, A. M.V.M.; AMORIM, M. J. B. *Encytraeus crypticus* (Oligochaeta) is able to regenerate - considerations for a stardad ecotoxicological species. **Applied Soil Ecology**. v. 107, p. 320-323, 2016. Disponível: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139316302013>>. Acesso em: 09 mai 2022.

LOVADOURO, J. H. B.; MATOS, C. B.; LEITE, A. T. M.; CLEFF, M. B. Intoxicação por ivermectina em cães. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages, v. 13, n. supl., p. 55-56, 2013. Disponível: <<https://www.revistas.udesc.br/index.php/agrovetinaria/article/download/5523/3750/15325>>. Acesso em: 11 mai 2022.

MOLENTO, M. B. Ivermectina e saúde única: reposicionamento e a preocupação com o meio ambiente. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, São Paulo, v. 19, n. 1, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.36440/recmvz.v19i1.38175>> Acesso em: 29 abr 2022.

NEMAPLEX. **Characteristics of Taxonomic Groups with Soil-inhabiting Forms**. Disponível em: <<http://nemaplex.ucdavis.edu/Kingdoms/Annelida.htm>>. Acesso em: 10 mai 2022.

NOVAIS, S.; AMORIM, M. J. B.; RÖMBKE, J.; SOARES, A. M. V. M. Testes de evitamento com enquitraídeos (*Enchytraeus albidus*): efeitos de diferentes tempos de exposição, compostos químicos e propriedades do solo. **CAPTAR ciência e ambiente para todos**, v. 1, n.1, p. 104-112, 2009. Disponível em:

<<https://doi.org/10.34624/captar.v1i1.11019>>.

Acesso em: 29 abr 2022.

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, n. 4, p. 1063–1071, 2012.

RÖMBKE, J., SCHMELZ, R. M.; PÉLOSI, C. **Effects of Organic Pesticides on Enchytraeids (Oligochaeta) in Agroecosystems: Laboratory and Higher-Tier Tests**, *Frontiers in Environmental Science*, 5 (May), 2017.

VSDB: Veterinary Substances DataBase - ivermectina. **Agriculture & Environment Research Unit (AERU), University of Hertfordshire**, 2021. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/Reports/1455.htm#none>>. Acesso em 29 abr 2022.