



UDESC

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – UDESC/OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA - PPGZOO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
**EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS
DO FÁRMACO FIPRONIL E
PRODUTOS DERIVADOS DE NIM
(*Azadirachta indica*) SOBRE
ORGANISMOS BIOINDICADORES
DE CONTAMINAÇÃO
AMBIENTAL**

TALYTA ZORTÉA

CHAPECÓ, 2017

TALYTA ZORTÉA

**EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DO FÁRMACO FIPRONIL E
PRODUTOS DERIVADOS DE NIM (*Azadirachta indica*) SOBRE
ORGANISMOS BIOINDICADORES DE CONTAMINAÇÃO
AMBIENTAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Relação Clima-Solo-Planta-Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia**.

Orientador (a): Dr. Dilmar Baretta

Co-orientador(es): Dr. Aleksandro Schafer da Silva

Dr. José Paulo Sousa

Chapecó, SC, Brasil

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UESC

Zortéa, Talyta

EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DO FÁRMACO FIPRONIL E
PRODUTOS DERIVADOS DE NIM (Azadirachta indica)
SOBRE ORGANISMOS BIOINDICADORES DE CONTAMINAÇÃO
AMBIENTAL / Talyta Zortéa. - Chapecó , 2017.
117 p.

Orientador: Dilmar Baretta

Co-orientador: Aleksandro Schafer da Silva

Co-orientador: José Paulo Sousa

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado
de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do
Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia,
Chapecó, 2017.

1. impacto ambiental. 2. ecotoxicologia
terrestre. 3. solos naturais. 4. fauna do solo. 5.
metabólitos fipronil. I. Baretta, Dilmar. II.
Schafer da Silva, Aleksandro. Sousa, José
Paulo. III. Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste,
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

**Universidade do Estado de Santa Catarina
UDESC Oeste
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DO FÁRMACO FIPRONIL E
PRODUTOS DERIVADOS DE NIM (*Azadirachta indica*) SOBRE
ORGANISMOS BIOINDICADORES DE CONTAMINAÇÃO
AMBIENTAL**

Elaborada por
Talyta Zortéa

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

Comissão Examinadora:



Dr. Dilmar Baretta
(Presidente/Orientador) (UDESC-Oeste)



Dr. Paulo Roger Lopes Alves
Membro externo PPGZOO (UFFS)



Dr. Luís Carlos Iuñes de Oliveira Filho
Membro Externo PPGZOO (Unoesc)

Chapecó, 09 de março de 2017.

Ao meu filho Bento Augusto, que foi a conquista mais valiosa que tive durante o período do mestrado e o qual cultivo um amor incondicional!

Aos meus pais Santin e Maria e ao meu companheiro Anderson pelo apoio e amor durante todo o tempo...

Dedico...

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus por me conceder toda a luz e força durante todo o tempo e nunca me deixar desistir.

Aos meus pais que lutaram muito para que eu pudesse realizar meu sonho, e acreditaram em mim sempre me dando muito amor e força para continuar.

Ao meu grande amor Anderson, que esteve sempre junto comigo me incentivando e segurando minha mão e me confortando durante o momento mais mágico das nossas vidas que foi a chegada do nosso Anjo Bento Augusto.

Ao meu professor orientador Dr. Dilmar a quem admiro muito, pela amizade e por me ensinar os primeiros passos na ciência do solo e por repassar seus conhecimentos e suas experiências com toda a dedicação e compreensão.

Aos professores coorientadores Dr. Aleksandro e Dr. José Paulo que sempre estiveram a disposição para que eu pudesse tirar todas as dúvidas e me auxiliar na construção dos meus conhecimentos.

As minhas queridas amigas Julia Segat, Ana Maccari e Manuela Testa que estiveram comigo me auxiliando e repassando seus conhecimentos durante todo tempo, e principalmente pela amizade sincera e confortante que quero para a vida inteira.

Ao meu amigo Marcio Gonçalves pelos inúmeros conselhos que foram valiosos para me manter emocionalmente saudável durante as turbulências deste período e pela amizade e conversas que tivemos, muito obrigada.

Aos meus irmãos de Laboratório de Solos os velhos e os novos, agradeço a TODOS, pois criamos laços de família e amor de irmão, durante todos os momentos compartilhamos alegrias.

Aos meus amigos Edpool, Vanessa, Daniel, Suelen, Junior, Francisca, Patrick, Eduan que me ajudaram a desenvolver meu trabalho, sempre comparecendo.

A UDESC por me permitir cursar Zootecnia com ensino de alta qualidade.

Enfim, a todos que de alguma maneira colaboraram não apenas no meu curso, mas em toda a minha caminhada humana e profissional até aqui, a todos.

MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

**EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DO FÁRMACO FIPRONIL E
PRODUTOS DERIVADOS DE NIM (*Azadirachta indica*) SOBRE
ORGANISMOS BIOINDICADORES DE CONTAMINAÇÃO
AMBIENTAL**

AUTOR: Talyta Zortéa

ORIENTADOR: Dilmar Baretta

Chapecó, 09 de Março de 2017

Medicamentos veterinários são considerados potenciais contaminantes do meio ambiente, a principal forma de entrada no ambiente terrestre é através da excreção dos animais via fezes e urina, a presença de resíduos de medicamentos veterinários nos dejetos é capaz de afetar os organismos não alvos. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos ecotoxicológicos de fármacos veterinários em diferentes solos tropicais sobre a reprodução e sobrevivência de três organismos edáficos. Os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizados e divididos em quatro etapas. Na primeira etapa foram avaliados quatro fármacos comerciais sobre a reprodução de colêmbolos (*Folsomia candida*) utilizando o Solo Artificial Tropical (SAT), os medicamentos testados foram ivermectina, fipronil, fluazuron e closantel. Na segunda etapa foram avaliados os efeitos do fipronil e compostos fitoterápicos a base de nim (*Azadirachta indica*), sendo extrato de nim e torta de nim, sobre de minhocas *Eisenia andrei*, enquitreídeos *Enchytraeus crypticus* e colêmbolos *F. candida*, em Latossolo Vermelho distrófico (LVd) e SAT. Os realizados nesta etapa foram de sobrevivência e reprodução dos três organismos, e as doses de cada medicamento foram definidas em ensaios prévios. A terceira etapa avaliou-se a sobrevivência e reprodução de colêmbolos em solos contaminados com fipronil e seus metabólitos fipronil sulfona e desulfenil, foram utilizados LVd, Neossolo Quartzarênico Órtico típico (Rqo) e SAT. A quarta etapa foi dividida em duas partes, inicialmente bovinos foram tratados com fipronil e torta de nim, sequencialmente os dejetos destes animais foram coletados em diferentes tempos, 0, 5, 15 e 60 dias após o início do tratamento, com os dejetos provenientes das coletas foram realizados testes com colêmbolos em RQo. Todos os quatro fármacos veterinários avaliados na etapa 1 apresentaram toxicidade sobre os colêmbolos, sendo o fipronil o mais tóxico. Nos testes com fipronil e nim, o fipronil apresentou efeito tóxico principalmente em colêmbolos onde o valor de LOEC foi de 0,15 mg kg⁻¹, e os valores de EC50 foram de 0,26 e 0,29 mg kg⁻¹ para LVd e SAT, respectivamente. Os compostos a base de nim quando aplicado na sua forma original no solo (torta e extrato) não causaram efeitos de toxicidade a minhocas e enquitreídeos, e para colêmbolos a redução foi inferior a 10% apenas nas doses mais elevadas. Os metabólitos fipronil sulfona e desulfenil apresentaram efeitos de toxicidade semelhante ao composto original, no entanto as reduções na sobrevivência e reprodução de colêmbolos foram observadas principalmente em função das características do solo, onde nos solos com textura mais arenosa (SAT e RQo) houve maior toxicidade em comparação com o LVd. As fezes dos animais tratados com fipronil e nim após 5 e 15 dias do tratamento reduziram significativamente a reprodução dos colêmbolos. As fezes dos animais que receberam nim foram as mais tóxicas, diferente de

quando aplicado à torta de nim diretamente no solo. Como conclusão percebe-se que os efeitos de toxicidade dos fármacos testados estão intimamente interligados com a espécie e o tipo de solo. Além disso, a magnitude dos efeitos pode mudar após a excreção dos medicamentos no organismo animal.

Palavras-chave: impacto ambiental, ecotoxicologia terrestre, solos naturais, fauna do solo, metabólitos fipronil

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS OF THE FIPRONIL DRUG AND NIM DERIVED PRODUCTS (*Azadirachta indica*) ON ENVIRONMENTAL CONTAMINATION BIOINDICATORS

AUTHOR: Talyta Zortéa
ADVISER: Dilmar Baretta
Chapecó, March 09, 2017.

Veterinary drugs are considered as potential contaminants of the environment, the main form of entry into the terrestrial environment is through the excretion of animals via feces and urine, the presence of residues of veterinary drugs in the manure is capable of affecting non-target organisms. The objective was to evaluate the ecotoxicological effects of veterinary drugs in different tropical soils on the reproduction and survival of three edaphic organisms. The tests were carried out in a completely randomized design and divided into four stages. The first stage consisted of evaluating four commercial drugs on *Folsomia candida* using Tropical Artificial Soil (TAS), the drugs tested were ivermectin, fipronil, fluazuron and closantel. In stage two, the effects of fipronil and neem-based phytotherapeutic compounds (*Azadirachta indica*), on *Eisenia andrei* earthworms, *Enchytraeus crypticus* enchytraeidae and *Folsomia candida* springtails, on Oxisoil (LVd) and TAS were evaluated. Those performed at this stage were for survival and reproduction of the three organisms, and the doses of each drug were defined in previous trials. The third stage evaluated the survival and reproduction of springtails in soils contaminated with fipronil and its metabolites fipronil sulfone and desulfinitil, were used LVd, Entisoil (Rqo) and TAS. The fourth stage was divided into two parts, initially cattle were treated with fipronil and neem cake, sequentially the manure of these animals were collected at different times, 0, 5, 15 and 60 days after starting treatment with the Samples from the collections were tested with springtails in RQo. All four veterinary drugs evaluated in stage 1 showed toxicity on the collembolids, with fipronil being the most toxic. In the fipronil and neem tests, fipronil showed a toxic effect mainly on springtails where the LOEC value was 0.15 mg kg^{-1} , and the EC_{50} values were 0.26 and 0.29 mg kg^{-1} for LVd and TAS, respectively. The neem-based compounds when applied in their original form in the soil (cake and extract) did not cause toxicity effects to earthworms and enchytraeidae, and for springtails the reduction was less than 10% only in the higher doses. Fipronil sulfone and desulfinitil metabolites showed toxicity effects similar to the original compound, however, reductions in springtails survival and reproduction were observed mainly due to soil characteristics, where in sandy loam soils (TAS and RQo) showed higher toxicity in comparison with the LVd. Feces from animals treated with fipronil and neem after 5 and 15 days of treatment significantly reduced colony reproduction. The feces of the animals that received neem were the most toxic, different from when applied to the neem cake directly in the soil. In conclusion, the toxicity effects of the drugs tested are closely related to the species and soil type. **Keywords:** Environmental impact, terrestrial ecotoxicology, natural soils, soil organisms, fipronil metabolites

LISTA DE FIGURAS

- Figure 2.1 - Survival of *F. Candida* springtails (10 age-synchronized organisms) when exposed for 28 days to soil spiked with increasing doses of fipronil (A), fluazuron (B), ivermectin (C) and closantel (D). Asterisks indicate significant reduction in the number of adults in relation to the control treatment (one-way ANOVA, Dunnett test - $P < 0.05$). (\top) standard deviation ($n = 5$).....40
- Figure 2.2 - Average of juveniles *F. Candida* in Tropical Artificial Soil (SAT) spiked with increasing doses of fipronil (A), ivermectin (B), fluazuron (C) and closantel (D). Asterisks indicate significant reduction in the number of juveniles in relation to the control treatment (one-way ANOVA, Dunnett test - $P < 0.05$). (\top) standard deviation ($n = 5$).....41
- Figura 2.3 - Sobrevivência (linhas) e reprodução (barras) de *Eisenia andrei* quando exposta a solo não contaminado e contaminado com fipronil em Latossolo Vermelho distrófico (A) e Solo Artificial Tropical (B) l. (\top) desvio-padrão ($n = 5$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos, ($p < 0,05$; one-way ANOVA seguido de teste de Dunnett)..... 65
- Figura 2.4 - Sobrevivência (linhas) e reprodução (barras) de *Enchytraeus crypticus* quando exposto a solo não contaminado e contaminado com fipronil em Latossolo Vermelho distrófico (A) e Solo Artificial Tropical (B). (\top) desvio-padrão ($n = 5$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos, ($p < 0,05$; one-way ANOVA seguido de teste de Dunnett).....66
- Figura 2.5 - Sobrevivência (linhas) e reprodução (barras) de *Folsomia candida* quando exposta a solo não contaminado e contaminado com fipronil em Latossolo Vermelho distrófico (A) e Solo Artificial Tropical (B). (\top) desvio-padrão ($n = 5$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos, ($p < 0,05$; one-way ANOVA seguido de teste de Dunnett).....66
- Figura 2.6 - Sobrevivência (linhas) e reprodução (barras) de *Folsomia candida* quando exposta a solo não contaminado e contaminado com torta de nim em Latossolo Vermelho distrófico (A) e Solo Artificial Tropical (B). (\top) desvio-padrão ($n = 5$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos, ($p < 0,05$; one-way ANOVA seguido de teste de Dunnett).....67
- Figura 2.7 - Metabólitos relevantes ou produtos de degradação do fipronil (Adaptado de Pei et al., 2004)87
- Figura 2.8 - Número médio de juvenis de *Folsomia candida* quando exposta a solo não contaminado e contaminado com o medicamento veterinário com ingrediente ativo fipronil em Neossolo Quartzarênico Órtico típico. (\top) desvio-padrão ($n = 6$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos, ($p < 0,05$; one-way ANOVA seguido de teste de Dunnett).....88
- Figura 2.9 - Número médio de juvenis de *Folsomia candida* quando exposta a solo não con-

taminado e contaminado com o metabólito fipronil desulfenil (A) Latossolo Vermelho distrófico (LVd), (B) Solo Artificial Tropical (SAT) e (C) Neossolo Quartzarênico Órtico típico (RQo). (\top) desvio-padrão ($n = 8$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos, ($p < 0,05$; one-way ANOVA seguido de teste de Dunnett).....89

Figura 2.10 - Número médio de juvenis de *Folsomia candida* quando exposta a solo não contaminado e contaminado com o metabólito fipronil sulfona (A) Latossolo Vermelho distrófico (LVd), (B) Solo Artificial Tropical (SAT) e (C) Neossolo Quartzarênico Órtico típico (RQo). (\top) desvio-padrão ($n = 8$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos, ($p < 0,05$; one-way ANOVA seguido de teste de Dunnett).....90

Figura 2.11 - Número médio de juvenis de colêmbolos *Folsomia candida* expostos a solo contaminado com 4 Mg ha⁻¹ de dejetos de bovinos no dia 0 (sem aplicação de medicamentos) em Neossolo Quartzarênico Órtico típico. (\top) desvio-padrão ($n = 8$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos, ($p < 0,05$; one-way ANOVA seguido de teste de Dunnett).....98

Figura 2.12 - Número médio de juvenis de colêmbolos *Folsomia candida* expostos a solo contaminado com 4 Mg ha⁻¹ de dejetos de bovinos 5 dias após aplicação de medicamentos fipronil e torta de nim em Neossolo Quartzarênico Órtico típico. (\top) desvio-padrão ($n = 8$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos, ($p < 0,05$; one-way ANOVA seguido de teste de Dunnett).....98

Figura 2.13 - Número médio de juvenis de colêmbolos *Folsomia candida* expostos a solo contaminado com 4 Mg ha⁻¹ de dejetos de bovinos 15 dias após aplicação de medicamentos fipronil e torta de nim em Neossolo Quartzarênico Órtico típico. (\top) desvio-padrão ($n = 8$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos, ($p < 0,05$; one-way ANOVA seguido de teste de Dunnett).....99

LISTA DE TABELAS

Table 2.1 Ecotoxicological endpoints (NOEC _{reprod} , LOEC _{reprod} , EC ₅₀ and LC ₅₀) derived for reproduction data of <i>Folsomia candida</i> exposed to the four different compounds assessed.....	40
Tabela 2.2. Parâmetros físicos e químicos do Latossolo Vermelho distrófico* (LVd) e do Solo Artificial Tropical (SAT).	64
Tabela 2.3. Critérios de validação dos testes conduzidos com organismos <i>E. andrei</i> segundo normas ISO 11268-2 (1998), para extrato de nim, torta de nim e fipronil em LVd e SAT.	64
Tabela 2.4. Critérios de validação dos testes conduzidos com organismos <i>E. crypticus</i> segundo normas ISO 16387 (2004), para extrato de nim, torta de nim e fipronil em LVd e SAT.....	64
Tabela 2.5. Critérios de validação dos testes conduzidos com organismos <i>F. candida</i> segundo normas ISO 11267 (1999), para extrato de nim, torta de nim e fipronil em LVd e SAT.....	65
Tabela 2.6. Parâmetros físicos e químicos do Latossolo Vermelho distrófico* (LVd), do Solo Artificial Tropical (SAT) e Neossolo Quartzarênico Órtico típico (RQo).....	86
Tabela 2.7. Parâmetros ecotoxicológicos (NOEC, LOEC, LC ₅₀ e EC ₅₀) calculado com base em teste de sobrevivência e reprodução de colêmbolos <i>Folsomia candida</i> , expostos ao Neossolo Quartzarênico Órtico típico (RQo) contaminado com um fármaco veterinário a base de fipronil (valores em mg kg ⁻¹ solo seco).....	86
Tabela 2.8. Parâmetros ecotoxicológicos (NOEC, LOEC, LC ₅₀ e EC ₅₀) calculado com base em teste de sobrevivência e reprodução de colêmbolos <i>Folsomia candida</i> , expostos ao Latossolo Vermelho distrófico (LVd), Solo Artificial Tropical (SAT) e Neossolo Quartzarênico Órtico típico (RQo) contaminado com o metabólito fipronil desulfenil e fipronil sulfona (valores em mg kg ⁻¹ solo seco).....	86

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Página de publicação do artigo Toxicity of four veterinary pharmaceuticals on the survival and reproduction of <i>Folsomia candida</i> in tropical soils na revista <i>Chemosphere</i>	115
Anexo 2 - Carta de aprovação do Comitê de ética em Experimentação Animal (CTEA) da Universidade de Santa Catarina para realização de experimento com os animais...	116
Anexo 2.1 - Sobrevivência (linhas) e reprodução (barras) de <i>Eisenia andrei</i> quando exposta a solo não contaminado e contaminado com torta de nim em Latossolo Vermelho distrófico (A) e Solo Artificial Tropical (B). (T) desvio-padrão ($n = 5$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos, ($p < 0,05$; one-way ANOVA seguido de teste de Dunnett).....	67
Anexo 2.2 - Sobrevivência (linhas) e reprodução (barras) de <i>Eisenia andrei</i> quando exposta a solo não contaminado e contaminado com extrato de nim em Latossolo Vermelho distrófico (A) e Solo Artificial Tropical (B). (T) desvio-padrão ($n = 5$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos, ($p < 0,05$; one-way ANOVA seguido de teste de Dunnett).	68
Anexo 2.3 - Sobrevivência (linhas) e reprodução (barras) de <i>Enchytraeus crypticus</i> quando exposta a solo não contaminado e contaminado com torta de nim em Latossolo Vermelho distrófico (A) e Solo Artificial Tropical (B). (T) desvio-padrão ($n = 5$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos, ($p < 0,05$; one-way ANOVA seguido de teste de Dunnett).....	68
Anexo 2.4 - Sobrevivência (linhas) e reprodução (barras) de <i>Enchytraeus crypticus</i> quando exposta a solo não contaminado e contaminado com extrato de nim em Latossolo Vermelho distrófico (A) e Solo Artificial Tropical (B). (T) desvio-padrão ($n = 5$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos, ($p < 0,05$; one-way ANOVA seguido de teste de Dunnett).....	69

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.1	<i>Bovinocultura no Brasil</i>	12
1.2	<i>Controle de carrapatos</i>	13
1.3	<i>Extratos vegetais no controle de carrapatos</i>	14
1.4	<i>Nim indiano</i>	15
1.5	<i>Fipronil</i>	16
1.6	<i>Metabólitos fipronil</i>	17
1.7	<i>Medicamentos veterinários e meio ambiente</i>	18
1.8	<i>Organismos bioindicadores de qualidade do solo</i>	19
1.9	<i>Ecotoxicologia como ferramenta para análise de contaminação ambiental</i>	20
2	CAPÍTULO II.....	22
2.1	ARTIGO I - Toxicity of four veterinary pharmaceuticals on the survival and reproduction of <i>Folsomia candida</i> in tropical soils.....	23
2.1.1	Abstract.....	23
2.1.2	Introduction.....	24
2.1.3	Material and methods.....	25
2.1.4	Results.....	28
2.1.5	Discussion.....	29
2.1.6	References.....	34
2.2	MANUSCRITO II - Efeitos ecotoxicológicos de medicamentos veterinários sobre organismos edáficos em solos tropicais.....	42
2.2.1	RESUMO.....	42
2.2.2	ABSTRACT.....	43
2.2.3	INTRODUÇÃO.....	44
2.2.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.2.5	RESULTADOS.....	49
2.2.6	DISCUSSÃO.....	51
2.2.7	CONCLUSÃO.....	55
2.2.8	REFERÊNCIAS.....	56
2.3	MANUSCRITO III - Avaliação ecotoxicológica do fipronil e seus metabólitos sobre colêmbolos em solos tropicais.....	69
2.3.1	RESUMO.....	69
2.3.2	ABSTRACT.....	70
2.3.3	INTRODUÇÃO.....	71
2.3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	72
2.3.5	RESULTADOS.....	75

2.3.6	DISCUSSÃO	76
2.3.7	CONCLUSÕES	78
2.3.8	REFERÊNCIAS.....	79
2.4	MANUSCRITO IV - EFEITOS DE RESÍDUOS DE FÁRMACOS VETERINÁRIOS NAS FEZES DE BOVINOS SOBRE ORGANISMOS NÃO-ALVO.	90
2.4.1	RESUMO.....	90
2.4.2	ABSTRACT.....	90
2.4.3	INTRODUÇÃO	91
2.4.4	MATERIAL E MÉTODOS	92
2.4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	94
2.4.6	REFERÊNCIAS.....	96
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
4	REFERÊNCIAS.....	102

1 CAPÍTULO I REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Bovinocultura no Brasil*

Em âmbito mundial, o Brasil ocupa posição de destaque na pecuária bovina, de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture - USDA), em 2016 o Brasil deteve o segundo maior rebanho de bovinos, sendo responsável por 22,5% do rebanho mundial, atrás apenas da Índia (USDA, 2017).

Apesar de o Brasil possuir o segundo maior rebanho do mundo ainda não é capaz de alcançar eficiência na produção, o grande obstáculo ainda na produtividade é determinado por vários fatores, dentre eles as doenças infecciosas e parasitos, comprometem muitas vezes o processo de produção e retardando o desenvolvimento animal (STOTZER et al., 2014). Ocorrências de parasitos internos e externos em bovinos são muito comuns no Brasil, uma vez que a predominância de climas tropicais e subtropicais favorece o desenvolvimento desses agentes (GRISI et al., 2014).

O carrapato (*Rhipicephalus microplus*) é considerado um grande vilão na pecuária brasileira. É um ectoparasita hematófago originário da Ásia, cujo principal hospedeiro é o bovino, com importantes vetores de agentes patogênicos como *Anaplasma* e *Babesia* (PEREIRA et al., 2008; AUBRY e GEALE, 2011; SILVA et al., 2016), responsáveis pelo complexo denominado de “tristeza parasitária bovina” (TPB). Quando em condições de infestações nos animais, os carrapatos são capazes de causar prejuízos na produtividade, em virtude do estresse, perda de peso, danos ao couro, além de gastos relacionados ao controle químico deste parasito (SILVA et al., 2010).

As perdas anuais foram estimadas por Grisi et al. (2014) considerando os efeitos negativos da infestações por carrapatos sobre a produtividade do gado em relação as perdas de rendimento em produção de leite e ganho de peso, foram de US\$ 3,24 bilhões por ano. Na produção de leite estima-se que os danos causados por carrapatos podem causar redução de 90,24 L por vaca por lactação (RODRIGUES e LEITE, 2013). As estimativas dos prejuízos causados pelo carrapato em bovinos de corte foram relatadas por Jonsson (2006), que determinou perdas diárias de 1,18 e 1,37 gramas por carrapato por animal para *Bos taurus x Bos indicus* gado e *B. taurus*, respectivamente.

1.2 *Controle de carrapatos*

O controle de carrapatos em bovinos pode ser realizado através da adoção de técnicas de manejo integrada com aplicação de produtos químicos (SUAREZ et al., 2016), no entanto, o controle baseia-se principalmente no uso intensivo e indiscriminado de produtos químicos que são capazes de deixar resíduos tóxicos na carne e leite, além de apresentar efeitos nocivos ao animal e ao meio ambiente (MOLENTO, 2005; VIVAN, 2005; SILVA et al., 2010; LEW-TABORA e RODRIGUEZ VALLE, 2016). A utilização destes compostos em larga escala, ao longo do tempo acarreta por muitas vezes a resistência dos carrapatos, tornando assim o produto ineficiente no controle desta praga (ROSSETO, 2013; ABBAS et al., 2014; WELLINGTON et al., 2017).

Um levantamento realizado pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL, 2014), apontou que os setores de bovinocultura de carne e leite aparecem como o maior mercado consumidor de produtos veterinários no Brasil, respondendo por 55% do faturamento total do segmento, seguida pela suinocultura (15,3%) e pela avicultura (14,2%), e o restante é distribuído por outras espécies animais, incluindo os animais domésticos.

O uso inadequado de carrapaticidas em conjunto com a falta de orientação técnica de como controlar os carrapatos vem se tornando um grande problema na produção animal, pois estes fatores contribuem para a formação de cepas resistentes (PAZINATO et al., 2014). Os produtos a base de organofosforados, os piretróides e, em alguns casos, os amidínicos já não controlam mais eficientemente os carrapatos em várias regiões do país (MARTINS, 2006). Em estudo realizado por Pazinato et al. (2014), apontaram que a resistência de carrapatos é o principal problema das propriedades rurais em Santa Catarina, sendo que, 81,7% da população de carrapatos de diferentes propriedades do Oeste catarinense apresentou resistência a um ou mais fármacos carrapaticidas.

Atualmente, há uma procura crescente de medidas alternativas para reduzir a exposição dos animais a carrapatos, tais como gestão de habitat, a separação de gado de áreas infestadas por carrapatos ou a aplicação de agentes de controle biológico para as pastagens (KLINGEN e VAN DUIJVENDIJK, 2016; GILBERT et al., 2017). Além disso, outra alternativa que está sendo adotada para redução da resistência e atenuação dos efeitos tóxicos ao

animal, homem e meio ambiente de compostos químicos, é a utilização de óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas no controle de carrapato (CAMPOS et al., 2012; ADENUBI et al., 2016). Os óleos essenciais são possuem em sua composição terpenos e seus derivados, como os monoterpenos e sesquiterpenos, que em conjunto com os fenilpropanóides formam inseticidas naturais tão potentes quanto os piretróides (ROMERO, 2008). Entretanto ainda são poucos os estudos que avalia os compostos naturais no meio ambiente e os efeitos sobre organismos terrestres (VOLPATO et al., 2016a; VOLPATO et al., 2016b)

1.3 *Extratos vegetais no controle de carrapatos*

Diversas plantas possuem uma gama de compostos secundários, que possuem função ecológica, tais como de repelência contra animais herbívoros e, muitos destes compostos, também tem ação repelente eficaz contra mosquitos e outros artrópodes (BALANDRIN et al., 1985). Extratos e óleos essenciais de várias plantas são usados principalmente nos países "em desenvolvimento", onde as plantas podem ser cultivadas localmente ou colhidas de populações naturais, principalmente por apresentarem custo notavelmente inferior do que os produtos químicos sintéticos, que são frequentemente derivados petroquímicos (BALANDRIN et al., 1985).

Muitos dos compostos derivados de plantas possuem ação repelente que causam a morte de carrapatos e são extraídos de várias partes da planta, incluindo as flores, frutas, folhas e madeira (GARBOUI, 2008), com ampla utilização em aplicações antiparasitárias (BAKKALI et al., 2008). Os extratos de algumas famílias botânicas foram reconhecidos por apresentar atividades biológicas contra diferentes organismos, além disso, há um número crescente de estudos sobre o uso de óleos essenciais no campo veterinário, particularmente como agentes de controle contra ectoparasitas como piolhos, ácaros e carrapatos (CHAGAS et al., 2016). As vantagens do uso dos óleos essenciais sobre os tratamentos ectoparasitários convencionais estão associadas à sua eficácia ovicida, à ação repelente devido a seus componentes voláteis e ao efeito sobre a fecundidade do carrapato fêmea quando estão expostas a doses sub-letais de óleos essenciais (ELLSE e WALL, 2014).

Os compostos presentes nos óleos vegetais de grande interesse científico são principalmente, terpenóides e fenilpropanóides que são responsáveis pela maioria das propriedades biológicas dos óleos essenciais. Muitas moléculas de plantas são eficazes contra estirpes de organismos sensíveis a fármacos, bem como resistentes a fármacos (RAUT e KARUPPAYIL, 2014). Desta forma, o uso de óleos essenciais no controle da *R. microplus* mostra um grande potencial para o futuro como um método alternativo além de produtos químicos (PAZINATTO et al., 2016).

1.4 *Nim indiano*

A busca por métodos mais seguros e menos agressivos ao homem e meio ambiente, vem estimulando o uso de inseticidas com procedências naturais, os acaricidas a base de extrato vegetal são uma das opções (BROGLIO-MICHELETTI et al., 2010). O nim (*Azadirachta indica*) possui efeito acaricida sobre os carrapatos (SILVA et al., 2008), sendo a espécie botânica que mais desperta interesse aos estudiosos por ser classificada como um pesticida de alta eficiência e de baixo efeito residual (MARTINEZ, 2002; AGUIAR-MENEZES, 2005).

A árvore de nim possui uma grande capacidade de adaptação, nativa da Índia e Birmânia, é de rápido crescimento com longa vida produtiva de 150-200 anos, com capacidade de sobreviver em seca, solos pobres, temperaturas muito quentes de até 44 °C e baixa temperaturas podendo chegar a 4 °C e possui alto teor de óleo de 39,7-60% (CAMPOS et al., 2016). Uma árvore de nim madura produz 30-50 kg de frutas a cada ano (BENELLI et al., 2017).

Um grande número de metabólitos secundários é encontrado em diferentes partes da árvore do nim, com grande predominância de terpenóides. Frutos e folhas são ricas em limonóides (CHIANESE et al., 2010), casca do caule em diterpenos, enquanto a casca da raiz é capaz de produzir tanto tri e diterpenos (DILSHAD et al., 2015). Em particular, as sementes tem sido reconhecidas como uma fonte prolífica de limonóides e sua composição química é dependente do estágio de maturação (SIDDIQUI et al., 2009).

O principal composto presente no nim é azadirachtina, importante no controle de pragas, pois possui largo espectro de ação, sendo capaz de afetar a sobrevivência, reduzir a oviposição e inibir a eclosão dos ovos dos carrapatos (SILVA et al., 2008). Não tem ação fitotó-

xica, é praticamente atóxica ao homem e não agride o meio ambiente (MARTINEZ, 2002; ISMAN, 2006).

O modo de ação do composto azadirachtina presente em grande quantidade no nim, inibe significativamente a atividade enzimática da Acetilcolinesterase (AChE) (GRUNDY e STILL, 1985; RYAN e BYRNE, 1988; MIYAZAWA et al., 1997; KEANE e RYAN, 1999; NATHAN et al., 2008; RATTAN, 2010) que é uma enzima chave responsável para a terminação do impulso nervoso por catalisar a hidrólise de neurotransmissores no sistema nervoso (WANG et al., 2004) e, em invertebrados, observa-se relação direta entre mudanças na atividade de AChE e toxicidade (DAY e SCOTT, 1990).

1.5 *Fipronil*

A molécula de fipronil pertence ao grupo químico dos fenilpirazoles, é considerado de amplo espectro de ação, com recomendações de uso agrícola, saneante, veterinário (controle de pulgas e carrapatos) e domissanitário (controle de baratas e pulgas) (PESTICIDE ACTION NETWORK, 2006).

O fipronil é um potente inibidor dos receptores do ácido γ - aminobutírico (GABA) associados aos canais de cloreto nos insetos (COLE et al., 1993; TINGLE et al., 2003; MARTINS, 2009) e sua molécula inibe não competitivamente o GABA (ácido γ -aminobutírico), se fixando ao receptor no interior do canal de cloro, impedindo o fluxo celular dos íons e anulando assim o efeito neuroregulador do GABA (SARTOR e SANTARÉM, 2006), causando desta forma a morte nos insetos por hiperexcitação e paralisia (ZHAO et al., 2004). A molécula de fipronil é considerada de amplo espectro e de degradação lenta, por consequência o produto da degradação (metabólitos) é mais tóxico e persistente do que o composto original (TINGLE et al., 2003).

Embora a molécula de fipronil seja largamente utilizada em diversos países, inclusive no Brasil (porém com uso proibido nas lavouras de soja) (OLIVEIRA, 2010), ainda possui seu uso proibido na Europa, devido ao elevado grau de toxicidade aos organismos não alvos expostos ao composto (STEVENS et al., 1998). Visto assim, a necessidade de se estudar os efeitos desta molécula dentro da produção animal e no controle de carrapatos.

Como fármaco veterinário o fipronil é comercializado em formas tópicas (*pour-on*) para controle de parasitas externos, principalmente carrapatos (CID et al., 2016). O fipronil está disponível para o controle de carrapatos em vários países da América Latina, mas não foi registrado nos EUA, União Europeia e Austrália para uso em animais (GEORGE et al., 2004). Na década de 90 a empresa Merial®, curiosamente introduziu este produto para controle de carrapatos apenas no Brasil, com período de carência de 100 dias (JUNQUERA, 2016). Por ser aplicado de forma tópica, quando em condições de campo com exposição à luz do sol e ao clima (chuva), o alto grau de eficácia do fipronil no gado é reduzido (DAVEY et al., 1998).

A molécula do fipronil apresenta características lipofílicas, e quando aplicado topicamente nos animais, é depositado nas glândulas sebáceas da pele, onde é liberado lentamente e isso permite um efeito residual bastante longo contra vários parasitas externos (GUNASEKARA e TROUNG, 2007). Após a absorção o fipronil é encontrado predominantemente nos tecidos adiposos. Excreção do fipronil ocorre principalmente através das fezes e em animais lactantes até 5% da dose absorvida pode ser excretada através do leite (JUNQUERA, 2016).

1.6 *Metabólitos fipronil*

Quando uma molécula química entra no ambiente geralmente é submetida a uma vasta gama de agentes biológicos (enzimas), químicos (hidrólise) e físicos (fotólise), que podem mudar sua natureza química (MANDAL e SINGH, 2013). Essas novas estruturas químicas, chamadas metabólitos ou produtos de degradação, têm propriedades diferentes do composto original e os efeitos destas alterações necessitam de uma avaliação tanto em termos de segurança ambiental como humana (MANDAL et al., 2013).

A degradação do fipronil resulta em quatro metabólitos principais, o fipronil sulfeto obtido pelo processo de redução (RAMESH e BALSUBRAMANIAN, 1999), fipronil sulfona por oxidação (BOBE et al., 1998a), fipronil amida por hidrólise (BOBE et al., 1998b, NGIM e CROSBY, 2001) e fipronil desulfínil pela fotólise (HAINZL e CASIDA, 1996). O principal metabólito do fipronil encontrado em vertebrados e invertebrados parece ser a sulfona de fipronil (HAINZL e CASIDA, 1996; HAINZL et al., 1998).

O produto fotodegradado fipronil desulfenil é extremamente estável e considerado mais tóxico que o composto original (USEPA, 1996). O metabólito fipronil sulfona é altamente tóxico para as aves e os metabólitos fipronil sulfona e sulfeto são mais tóxicos para os invertebrados de água doce do que o fipronil (PESTICIDE ACTION NETWORK-UK, 2000).

No entanto, os estudos sobre a degradação do fipronil na superfície (pele) de espécies domésticas são limitados (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 1997). Ramesh e Balasubramanian (1999) relataram que em condições básicas ($\text{pH} > 7$) e temperaturas elevadas induzem a hidrólise de fipronil, condições que podem ocorrer na superfície da pele de mamíferos. São poucos os dados diretamente aplicáveis sobre a toxicidade dos produtos de degradação do fipronil aplicados a organismos não-alvo.

1.7 *Medicamentos veterinários e meio ambiente*

Há uma crescente preocupação sobre os potenciais impactos dos medicamentos de uso veterinário no ambiente (MATAMOROS e BAYONA, 2006). Parasiticidas veterinários são administrados aos animais para controlar uma vasta gama de parasitas, incluindo vermes gastrintestinais, vermes de fígado, vermes pulmonares, piolhos, moscas do chifre, carrapatos e ácaros (FLOATE et al., 2005).

A aplicação de fármacos na pecuária intensiva é a principal forma de entrada no ambiente terrestre através dos dejetos (MANZETTI e GHISI, 2014; VASSILIS et al., 2016), sendo que, grande parte destes podem ser excretados como um composto original ou parcialmente metabolizados (TOLLS, 2001; COOPER et al., 2014), e as formas de excreção incluem o composto ativo e também metabólitos e produtos de transformação (DAUGHTON, 2007).

Os compostos podem ser aplicados via oral, topicamente (por exemplo, em aspersões ou *pour-ons*), via bolus intra-ruminal ou de forma injetável, após a administração as substâncias podem ser parcialmente metabolizadas nos animais antes de serem libertados junto com outros metabólitos nas fezes ou urina (BARBER e ALVINERIE, 2003). A taxa de excreção da substância depende do fármaco, da dosagem, bem como, do organismo ao qual é adminis-

trada (MELO et al., 2009). Sabe-se, contudo, que entre 40 e 90% do composto administrado é excretado sem serem metabolizados (JONES et al., 2003), ocasionando a persistência destes compostos por longos períodos no solo (FÖRSTER et al., 2009; ZHANG et al., 2016).

Outros fatores que levam ao aumento da toxicidade das fezes com resíduos de medicamentos de uso veterinário são o tempo, frequência de aplicação, persistência de compostos de origem e os seus metabólitos no meio ambiente (HALLEY et al., 1993).

Diversos estudos sobre o tema estão sendo conduzidos internacionalmente e têm detectado a presença destas substâncias, em pequenas concentrações (ng L^{-1} ou kg^{-1} a mg L^{-1} ou kg^{-1}), em diferentes matrizes ambientais, tais como excretas de animais, lagoas de tratamento de resíduos de origem animal, solos, águas superficiais e subterrâneas (BOXALL et al., 2006; MARTÍNEZ-CABALLO et al., 2007). A ocorrência destes compostos no ambiente pode impactar negativamente organismos aquáticos e terrestres, tanto em nível de toxicidade crônica quanto aguda (KEMPER, 2008).

1.8 *Organismos bioindicadores de qualidade do solo*

Os invertebrados do solo possuem características importantes para manter a qualidade do solo, uma vez que são organismos-chave na decomposição de material orgânico e liberação de nutrientes e desempenham um papel importante na formação de micro e macroestrutura do solo (BOTINELLI et al., 2015). Um grupo de organismos amplamente utilizados como bioindicadores de qualidade de solo são minhocas, os colêmbolos e enquitreídeos, por se destacarem entre os principais organismos utilizados em testes de ecotoxicidade terrestre, visto que possuem fácil adaptação em laboratório, ciclos de vida relativamente curtos (FOUNTAIN e HOPKIN, 2005) e alta sensibilidade aos poluentes (GREENSLADE e VAUGHAN, 2003; HAVLICEK, 2012).

Collembola é uma das ordens mais abundantes no ecossistema terrestre, e eles são usados para avaliar a qualidade de solos contaminados (SANDIFER e HOPKIN, 1997; AN et al., 2013, OLIVEIRA-FILHO e BARETTA, 2016; WINCK et al., 2017). Tais organismos desempenham papel fundamental e são responsáveis pela decomposição de matéria orgânica junto com muitos outros grupos (EISENHAUER et al., 2009). A espécie *Folsomia candida* é recomendada pela ISO (1999), sendo considerada mais representativa para avaliar a qualida-

de do solo (SMIT e VAN GESTEL, 1996; AN et al., 2013). Além disso, esses colêmbolos são considerados excelentes bioindicadores em ensaios ecotoxicológicos (FOUNTAIN e HOPKIN, 2005; BUCH et al., 2016). Portanto, o estudo da resposta de colêmbolos em solos contaminados é de grande interesse (SOUSA et al., 2006; SALMON et al., 2014), principalmente em relação aos fármacos veterinários, que vem sendo considerados contaminantes emergentes em locais de grande produção pecuária (BROOKS et al., 2007; DI NICA et al., 2015).

Mínhocas e enquiteídeos também apresentam sensibilidade a mudanças do ambiente, respondendo ao contato com poluentes no solo (Brown e Dominguez, 2010), portanto estes organismos através de suas repostas comportamentais e reprodutivas são capazes de apresentar o estado dos ecossistemas, além das mudanças ocorridas decorrentes de forças bióticas e abióticas através do tempo (Brown e Dominguez, 2010). Por este fato, são amplamente utilizada em ensaios ecotoxicológicos, uma vez que, essas características são úteis para programas de avaliação e monitoramento da qualidade ambiental (Rutgers et al. 2009).

Sabe-se que invertebrados terrestres são organismos não alvos que tem papel importante na manutenção do solo e estes podem ser afetados pela presença de contaminantes (USEPA, 1998). A presença medicamentos veterinários nos dejetos é capaz de afetar os organismos não alvos, que são responsáveis, juntamente com o intemperismo, na decomposição do esterco nas pastagens e ciclagem de nutrientes, de forma que apresentam ação funcional e economicamente importante no sistema (WALL e BEYNON, 2012; BEYNON, 2012; LUMARET et al., 2012). Os efeitos podem ter reflexos dentro de uma cadeia hierárquica biológica, seja a nível células, organismos, população e ecossistema (BÁRTÍKOVÁ et al., 2016). Assim, é necessário buscar alternativas para mensurar qual o nível de impacto que esses produtos causam no solo, sendo a ecotoxicologia terrestre uma ferramenta que possibilita avaliar os efeitos que os fármacos veterinários causam no ambiente solo (OLIVEIRA-FILHO e BARETTA, 2016).

1.9 *Ecotoxicologia como ferramenta para análise de contaminação ambiental*

De acordo com as diretrizes atuais sobre avaliação de risco ambiental na União Europeia, o risco dos medicamentos veterinários para os organismos do solo tem que ser avaliado

através de dados experimentais sobre o destino e os efeitos do fármaco. Todavia, a fim de garantir a qualidade dos dados e visando permitir a comparabilidade dos resultados, tais testes devem ser realizados de acordo com a padronização internacional das diretrizes (LIESS e BEKETOV, 2011; HOKE et al., 2016).

Já existem métodos mundialmente padronizados e validados de ensaios para a avaliação de risco de agrotóxicos e produtos químicos industriais. Desde 1984 a *Organization for Economic Cooperation and Development* (OCDE), publicou teste com invertebrados do solo, microrganismos e plantas. Alguns testes também foram desenvolvidos pela International Organization for Standardization (ISO).

A ecotoxicologia teve início na década de 30 e os primeiros estudos foram de avaliação dos efeitos de contaminantes ou poluentes em organismos aquáticos (ZAGATTO, 2006), sendo a área terrestre uma ciência mais recente. No solo, a ecotoxicologia é também um método eficiente para estimar o perigo potencial de substâncias (TEREKHOVA, 2011). Seu impacto geralmente é mensurado através de *endpoints*, como reprodução, através das concentrações de efeito, ou letalidade, através das concentrações letais, utilizando diversos organismos, dentre os quais estão os colêmbolos (AMORIM et al, 2012), as minhocas (PELOSI et al, 2013), os enquitreídeos (CHELINHO et al., 2013a), além de ácaros (CHELINHO et al, 2013b) e plantas (OLIVEIRA - FILHO et al., 2015).

A ecotoxicologia terrestre é a compreensão dos efeitos de curto e longo prazo de substâncias químicas sobre os ecossistemas edáficos, a observação dos efeitos de xenobióticos nos organismos terrestres é feita com o objetivo de proteger o funcionamento e a estrutura desses ecossistemas (ANDRÉA, 2012). O conhecimento ecotoxicológico permite avaliar a extensão do risco ambiental, estipular metodologias de vigilância e rastreamento da presença de tóxicos no ambiente e ainda orientar nas medidas de remediação (AZEVEDO e CHASIN, 2004).

2 CAPÍTULO II

ARTIGOS e MANUSCRITOS

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de um artigo publicado na revista Chemosphere, dois Manuscritos e uma nota prévia, com sua formatação de acordo com as orientações das revistas aos quais serão submetidos:

O Artigo I está formatado conforme normas da Revista Chemosphere:

ARTIGO I - Toxicity of four veterinary pharmaceuticals on the survival and reproduction of *Folsomia candida* in tropical soils

Os Manuscritos II, III e a Nota Científica VI estão formatados conforme as normas da Revista Brasileira de Ciência do Solo.

MANUSCRITO II - Efeitos ecotoxicológicos de medicamentos veterinários sobre organismos edáficos em solos tropicais

MANUSCRITO III - Avaliação ecotoxicológica do fipronil e seus metabólitos sobre colêmbolos em solos tropicais

MANUSCRITO IV - Efeitos de resíduos de fármacos veterinários nas fezes de bovinos sobre organismos não-alvo

2.1 ARTIGO I - Toxicity of four veterinary pharmaceuticals on the survival and reproduction of *Folsomia candida* in tropical soils

De acordo com normas para publicação em:

CHEMOSPHERE

Talyta Zortéa^a, Julia C. Segat^b, Ana Paula Maccari^b, José Paulo Sousa^c, Aleksandro S. Da Silva^a, Dilmar Baretta^a

^a Department of Animal Science, Centro de Educação Superior do Oeste da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, Brazil.

^b Department of Soil Science, Centro de Ciência Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC, Brazil.

^c Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Coimbra, Portugal.

*Corresponding author: E-mail: aleksandro_ss@yahoo.com.br (A.S. Da Silva) and dilmar.baretta@udesc.br (D. Baretta)

2.1.1 Abstract

This study aimed to evaluate the effect of veterinary pharmaceuticals (VPs) used to control endo- and ectoparasites in ruminants, on the survival and reproduction of the collembolan species *Folsomia candida*. Standard ecotoxicological tests were conducted in Tropical Artificial Soil and the treatments consisted of increasing dosages of four commercial products with different active ingredients: ivermectin, fipronil, fluazuron and closantel. Ecotoxicological effects were related to the class and mode of action of the different compounds. Fipronil and ivermectin were the most toxic compounds causing a significant reduction in the number of juveniles at the lowest doses tested (LOEC_{reprod} values of 0.3 and 0.2 mg kg⁻¹ of dry soil,

respectively) and similar low EC_{50} values (fipronil: 0.19 mg kg^{-1} dry soil, $CL_{95\%}$ 0.16 - 0.22; ivermectin: 0.43 mg kg^{-1} dry soil, $CL_{95\%}$ 0.09 - 0.77), although the effects observed in the former compound were possibly related to a low adult survival (LC_{50} of 0.62 mg kg^{-1} dry soil; $CL_{95\%}$: 0.25 - 1.06). For the latter compound no significant lethal effects were observed. Fluazuron caused an intermediate toxicity (EC_{50} of 3.07 mg kg^{-1} dry soil, $CL_{95\%}$: 2.26 - 3.87), and also here a decrease in adult survival could explain the effects observed at reproduction. Closantel, despite showing a significant reduction on the number of juveniles produced, no dose-response relationship nor effects higher than 50% were observed. Overall, all tested compounds, especially ivermectin, when present in soil even at sub-lethal concentrations, can impair the reproduction of collembolans and possibly other arthropods. However, the actual risk to arthropod communities should be further investigated performing tests under a more realistic exposure (e.g., by testing the dung itself as the contaminated matrix) and by deriving ecotoxicologically relevant exposure concentration in soil derived from the presence of cattle dung.

Keywords: soil fauna, ivermectin, fipronil, fluazuron, closantel.

2.1.2 Introduction

Cattle parasitism by both endo- and ectoparasites results in large financial losses for the cattle breeding industry worldwide, with Brazil alone reporting annual losses of up to US\$13.96 billion (Grisi et al., 2014). Since cattle raising represents a large segment of the agribusiness in Brazil, the use of veterinary pharmaceuticals (VPs) is high, with the sale of veterinary products to control parasites representing 22% of all veterinary drugs sold in the country (SINDAN, 2015).

Controlling parasites in cattle is accomplished through integrated management techniques using chemical products, which also considers aspects related to the host and not only to the parasites (Shalaby, 2013) in such a way that VPs can be applied orally, topically by aspersions or 'pour-ons', and via intra-ruminal or injectable bolus. After treatment of the animals, the parasiticides are excreted either via the urine or feces (Floate et al., 2005). The excretion rate depends on the compound, the dosage applied, and the body size of the animal in which the VP is being administered (Floate et al., 2005). However, for most VPs, between

40 and 90% of the compound administered is known to be excreted without being metabolized (Cooper et al., 2014). Among the mostly used compounds are those having ivermectin, fluazuron, fipronil and closantel as active ingredients. Ivermectin and fluazuron are used to control both ecto- and endoparasites in a wide range of livestock species (cattle, pigs and sheep), while fipronil is used to control ectoparasites mainly in beef cattle, and closantel is used to control endoparasites mainly in sheep and bovines.

Using animal waste for manuring is one of the main ways that these veterinary compounds are spread throughout ecosystems (Kreuzing, 2010; Cooper et al., 2014). Once in the environment, they may be transported and distributed into water or soil (Boxall, 2008; Horvat et al., 2012). These compounds can remain in the environment, causing direct or indirect impacts on non-target soil organisms, like soil invertebrates, that are known to play an important role in the transformation of the fecal material and in maintaining the soil's quality by being key drivers in the provision of several ecosystem services (Vandewalle et al., 2010). Despite the aforementioned, there is still a small number of existing studies that focus on the potential impact of these compounds on soil organisms (Römbke et al., 2010; Beynon, 2012; Lumaret et al., 2012; Bai and Ogbourne, 2016; Jochmann and Blanckenhorn, 2016). Thus, it is necessary to assess the level of impact that veterinary products have on soil fauna.

This paper has the major objective to investigate the effect of four commercial veterinary pharmaceuticals (with the above mentioned active ingredients ivermectina, fipronil, fluazuron and closantel) used to control cattle endo- and ectoparasites on the survival and reproduction of the non-target soil collembolan species *Folsomia candida* using standard ecotoxicological tests. This test organism was chosen due to its wide used as a standard species in ecotoxicological studies (ISO 11267, 1999) and due to its sensitivity to veterinary pharmaceutical products (Maccari et al., 2016).

2.1.3 Material and methods

2.1.3.1 Test organisms

Cultures of *Folsomia candida* were maintained on a mixture of plaster of Paris and activated carbon (10:1 v:v) as substrate, and kept under a light/dark photoperiod (12:12h) in a temperature-controlled room ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). The organisms were fed on a weekly basis with

yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Age-synchronized organisms (10 and 12 days old after hatching) were used in all tests performed.

2.1.3.2 Test soil

Ecotoxicological tests were performed using the Tropical Artificial Soil (TAS) which is an adaptation of the OECD artificial soil proposed by Garcia (2004). This soil is a mixture containing 70% sand, 20% kaolinite clay and 10% coconut fiber (sieved at 2-mm sieve). Soil pH was measured according to ISO guideline 10390 (ISO, 2005) and was adjusted to 6.0 ± 0.5 by adding CaCO_3 . Its water content was set to 65% of its the maximum water holding capacity (measured according the ISO guideline 11274 - ISO, 1998) (see next section).

2.1.3.3 Test substances and doses used

The treatments consisted of increasing doses of four commercial VPs with different active ingredients: Ivomec® (a.i., ivermectin), Topline® (a.i., fipronil), Acatak® (a.i., fluazuron) and Zuletel® (a.i., closantel). These compounds were chosen because of their large-scale use in livestock production in Brazil, in addition to their satisfactory results for controlling parasites. The tested doses of ivermectin and fipronil were determined based on a thorough literature search (Jensen et al., 2003; Diao et al., 2007; San Miguel et al., 2008; Jensen et al., 2009; Liebigh et al., 2010; Alves et al. 2014). For those compounds where no published information was available (fluazuron and closantel), their doses were based on the environmental excretion data of each product and a preliminary test (data not presented). All doses are reported in terms of active ingredient. For ivermectin the doses tested were: 0, 0.2, 0.5, 1.5, 4.0 and 10 mg kg^{-1} of soil (dry weight - DW); for fipronil: 0, 0.3, 0.5, 0.8, 1.2 and 2.0 mg kg^{-1} of soil DW; for fluazuron: 0, 0.3, 0.8, 2.0, 6.0 and 15.0 mg kg^{-1} of soil DW and for closantel: 0, 0.5, 2.0, 4.5, 9.0 and 18 mg kg^{-1} of soil DW.

The four tested products were insoluble in water, therefore it was necessary to solubilize them in acetone before soil spiking. One solvent dilution for each concentration was prepared in accordance to Jensen et al. (2003) and ISO 11267 (1999). Following the homogenization, the batches of spiked soil was kept in a fume hood for a period of 12 hours to ensure that all the acetone had evaporated. Afterwards, the amount of water required to correct

the soil moisture to 65% of its maximum water holding capacity was added and, subsequently, the test organisms were added. For each test an extra “solvent control” treatment (soil spiked with acetone only) was setup in order to assess the possible effects of the solvent on the reproductive performance of test organisms.

2.1.3.4 Test performance

The reproduction tests were conducted based on the ISO guideline 11267 (ISO, 1999) under a completely randomized design with five replicates per treatment. Each replicate consisted of a plastic pot (3.5 cm in diameter and 11.5 cm in height) filled with 30 g of soil spiked with a corresponding dose of a respective compound, to which 10 aged-synchronized collembola were added. The organisms were fed with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) given at the beginning of the test and after 14 days of incubation. Every week the pots were opened for aeration and to correct soil moisture. After 28 days, the content of each pot was transferred to another container in which water and a few drops of black ink were added. Following gentle stirring, the living individuals found on the surface were photographed and counted using ImageTool software (University of Texas Health Science Center, 2002). Adults and juveniles (separated by size) were counted independently.

2.1.3.5 Statistical Analysis

The survival and reproduction data were submitted to analysis of variance (One-way ANOVA) followed by the Dunnett test ($p < 0.05$) to determine $NOEC_{reprod}$ and $LOEC_{reprod}$ values. Prior to analysis data normality and homoscedasticity were checked via Kolmogorov-Smirnov and Levene tests respectively. When these assumptions were not fulfilled data were log transformed. The LC_{50} values (after 28 days of exposure) were estimated using PriProbit 1.63 software (Sakuma, 1998) based on the number of surviving adults, while the EC_{50} values (based on the number of juveniles) were estimated using Statistica Software 7.0 (2004), through non-linear regression models according to Environment Canada (EC, 2005): Gompertz model for the ivermectin and fluazuron and Exponential model for the fipronil. No EC_{50} value was calculated for closantel due to the absence of a clear dose response relationship and the absence of effects on the number of juveniles higher than 50%. The estimation method was Levenberg-Marquardt

and the fit of the model for the different compounds were evaluated via the analysis of the normality of the residuals via Q-Q plots.

Comparison between control and solvent-control treatments was done via a t-test for independent samples using Statistica Software 7.0 (2004).

2.1.4 Results

2.1.4.1 Validation of the ecotoxicological tests

All tests met the validation criteria established in the ISO guideline 11267 (ISO, 1999). At the control vessels, the adult survival rate was higher than 80% (average of 90%). The number of juveniles was higher than 100 per replicate (average of 429 juveniles) with the corresponding coefficient of variation (CV) being lower than 30% (CV of 7%).

The use of acetone as solvent in all compounds did not cause any effects neither on adult survival ($t < 0.001$, $p = \text{n.s.}$) nor on the number of juveniles ($t = 1.38$, $p = \text{n.s.}$) (data not presented).

2.1.4.2 Effects on adult survival

The collembola survival rate was significantly affected ($p < 0,05$) by fipronil and fluzaron (Figure 2.1A and 2.1B), with estimated LC_{50} values of 0.62 mg kg^{-1} of soil DW ($CL_{95\%}$: 0.25 - 1.06) and 2.15 mg kg^{-1} of soil DW ($CL_{95\%}$: n.d.), respectively, after 28 days of exposure. Since it was not possible to derive confidence limits for this latter value, it should be interpreted carefully. The other tested compounds, ivermectin and closantel, did not caused significant differences in adult survival when compared to the control treatment at the concentrations tested (Figure 2.1C and 2.1D).

2.1.4.3 Effects on reproduction

Significant effects on reproduction were observed in all compounds tested (Figure 2.2). For fipronil and ivermectin, a significant reduction ($p < 0,05$) in the number of juveniles was observed in the lowest dosage tested (0.3 and 0.2 mg kg^{-1} of soil DW, respectively) (Figures 2.2A and 2.2C), while for fluazuron and closantel that occurred at the second evaluated dosage, i.e.,

0.8 and 2.0 mg kg⁻¹ of soil DW, respectively (Figures 2.2B and 2.2D). For the latter compound no EC₅₀ value could be calculated due to the similar behavior observed in doses higher than 2.0 mg kg⁻¹ of soil DW (effects all lower than 50% in relation to control). Thus, based on the calculated EC₅₀ values (Table 2.1), the toxicity of these veterinary drugs towards *F. candida* is in the following order: fipronil \approx ivermectin > fluazuron \gg closantel.

2.1.5 Discussion

The results observed for fipronil showed both its high lethal and sub-lethal toxicity towards *F. candida*, with a significant reduction in adult survival and in reproduction at the lowest dosage tested (0.3 mg kg⁻¹ of soil DW). Similar results were found by San Miguel et al. (2008) in OECD soil, who reported a LOEC_{reprod} of *F. candida* of 0.25 mg kg⁻¹ of soil DW. Alves et al. (2014), testing a commercial formulation of fipronil (Standak) used as seed dressing, reported lower NOEC_{reprod} and LOEC_{reprod} values (0.06 and 0.12 mg kg⁻¹ of soil DW, respectively) for the same test organism and also in TAS. The EC₅₀ value in this study was 0.19 mg kg⁻¹ of soil DW and is in line with the results from Alves et al. (2014), who reported an EC₂₀ of 0.12 mg kg⁻¹ of soil DW.

Results for fipronil showed a similar response pattern on both adult mortality and reproduction along the doses tested, indicating that the decrease in the number of juveniles could be largely related to the death of adults. These results could be justified by the mode of action of this compound. Fipronil is a potent γ -Aminobutyric acid (GABA) receptor blocker that is associated with chloride channels in insects (Tingle et al., 2003). Its molecule fixes itself to the receptor inside the chlorine channel, preventing the cellular flow of ions and thereby nullifying the neuroregulator effect (Zhao et al., 2005; Narahashi et al., 2007), which originates the death of insects due to hyperexcitation and paralysis (Zhao et al., 2004). Furthermore, fipronil is considered to have a slow degradation, with the degradation products being more toxic and having a longer environmental persistence than the original compound (Tingle et al. 2003). To our knowledge, no data is published on the amount of fipronil (or related metabolites) in soil derived from excretion via feces. However, to underpin potential risks of these compounds in the field towards in-soil organisms, further studies are needed to assess not only the intrinsic sensitivity of *F. candida* and other test species to fipronil and

derived metabolites, but should be complemented by tests performed under a more realistic exposure, namely testing the dung material of treated animals. All these studies should be complemented by deriving actual exposure concentrations in the field for a proper assessment of risk.

Our results showed that ivermectin caused direct adverse effects on the reproduction of *F. candida*, even at lower doses, without causing a significant effect on adult survival. The $\text{NOEC}_{\text{reprod}}$ value was below the lowest dose tested (0.2 mg kg^{-1} of soil DW), a comparable value as the one reported by Jensen and Scott-Fordsmand (2012) ($\text{NOEC}_{\text{reprod}}$ below 0.25 mg kg^{-1} of soil DW) when testing effects of ivermectin in *multi-species system using an agricultural soil*. The EC_{50} value found in our study was 0.43 mg kg^{-1} of soil DW, which is similar to the values reported by Diao et al. (2007) who evaluated the effect of abamectin (from the avermectin family) on two collembolan species, namely *Folsomia fimetaria* (EC_{50} of 0.33 mg kg^{-1} of soil DW) and *F. candida* (EC_{50} of 0.68 mg kg^{-1} of soil DW).

The group of macrocyclic lactones (avermectins) act as agonists of the GABA neurotransmitter in nerve cells and bind to the glutamate-gated chlorine channels that cause hyperpolarization of the nerve and muscle cells of invertebrates, blocking the transmission of neural signals (Dourmishev et al., 2005; Geary and Moreno, 2012). Thus, avermectins cause the organisms to lose motor coordination, become paralyzed and die (Geary, 2005). However, the effects on the nervous system were not necessarily the cause of reduced reproduction, since adult mortality did not occur in our study. Macrocyclic lactones have been considered potent inhibitors of reproduction in several invertebrate species (Lumaret et al., 2012). Glancey et al. (1982) found that ants (*Solenopsis invicta*) exposed to low doses of avermectin presented a reduction in egg production and size and a series of histological deformities in the eggs, suggesting a direct effect of this compound on the endocrine system instead of an influence on other sub-lethal parameters or on survival.

One way for ivermectin to reach the soil compartment is through the excrements of the treated animals. Over 90% is excreted via bile and feces, and only around 2% excreted through urine (Canga et al., 2009). From these, 39 to 44% of the total is excreted in its unchanged form (Halley et al., 1989). The concentrations of ivermectin in bovine feces can reach up to 9 mg kg^{-1} of dry weight for the pour-on treatment (Sommer et al., 1992). However, the concentrations of ivermectin in manure after injectable treatment does not typically

exceed 4 mg kg^{-1} (Sommer and Steffansen, 1993). When this compound is excreted onto the soil, the molecule binds strongly to soil particles and its degradation occurs relatively slowly (Mougin et al., 2003; Prasse et al., 2009). Römcke et al. (2010) reported that the application of ivermectin at the dosage of 200 mg kg of body weight of dairy cattle, promotes excretion through feces that varies in concentrations of 0.31 and 0.81 mg kg^{-1} dry manure, and the rate of excretion is higher after 3 to 4 days of application of the compound. In addition, the authors detected concentrations of ivermectin in soil below dung pats up to 0.005 mg of ivermectin kg^{-1} of soil DW at depths up to 2 cm, with the concentration decreasing below 0.002 mg kg^{-1} of soil DW between 2-5 cm depth. Recently, Scheffczyk et al. (2016), when evaluating the concentration of ivermectin below dung pats from treated animals, found concentrations ranging from 0.02 mg kg^{-1} of soil DW after 3 months of exposure and $<0.006 \text{ mg kg}^{-1}$ of soil DW at 5 to 7 months after exposure.

Based on this information, it is expected that ivermectin can induce negative effects in the environment, affecting non-target soil organisms with a key role in soil processes, namely those organisms responsible for incorporating the manure into the soil (dung fauna) (Jensen and Scott-Fordsmand, 2012). It is well documented in numerous studies that ivermectin in feces causes negative effects on dung beetles, reducing the survival and diversity of these organisms (Iwasa et al., 2005; Lumaret et al., 2007; Liebig et al., 2010; Lumaret et al., 2012; Verdú et al., 2015). Based on results, it is still not possible to infer if the predicted concentration of ivermectin in the soil below the faecal cake (up to 0.02 mg kg^{-1}) is detrimental for reproduction of *F. candida*, since the lowest dose tested in our study (0.2 mg kg^{-1}) already induced significant reduction of individuals. This urges for more data evaluating doses below those tested in this study, to determine the effect of real ivermectin concentrations in field on soil organisms.

For fluazuron, the $\text{NOEC}_{\text{reprod}}$ and EC_{50} values were 0.80 and 3.06 mg kg^{-1} of soil DW, respectively, originating lower toxic effects than fipronil and ivermectin. Nevertheless, the observed effects on reproduction could also be related, as in the case of fipronil, to the low survival of adults after 28 days. The comparison with other studies is, in this case, difficult, since, to our knowledge, no studies are published on effects of this compound on collembolans. However, when evaluating another compound from the benzoylurea family, diflubenzuron, during in a long-term experiment, Perry et al. (1997) verified that the density

of *Sminthurus purpureus* was significantly lower in soils treated with 70 g ha⁻¹ of this product. Similar results were found by Adamski et al. (2009) while evaluating diflubenzuron in forest soil at a dosage of 7.2 mg per m² regarding the diversity of organisms over a 196-day period and found that collembola density decreased in 19%. The observed reduction in the number of juvenile collembola following exposure to fluazuron in this study, or the effects reported by the authors above, is related to the mode of action of these type of molecules (benzoylureas). They are insect growth regulators by inhibiting the synthesis of chitin, or its correct deposition in the cuticle (the largest structural component of arthropod exoskeletons), during insect's development (Hsiao et al., 2013), leaving them more sensitive to adverse effects.

As for the other studied compounds, fluazuron has also a high excretion rate. When applied via a subcutaneous injection of 1.5 mg kg⁻¹ of body weight, 62% to 81% of fluazuron was excreted in its unchanged form, and from this amount, 23% was excreted via feces, and only 1% via urine (FAO, 2014). Thus, cattle treated with fluazuron may excrete this compound via their feces, which in turn can be harmful to edaphic fauna (Sánchez-Bayo, 2011). As for fipronil, also for fluazuron no data on soil concentrations after feces excretion does exist. So, potential risks of this compound under field conditions to non-target soil organisms can only be assessed with further testing, complemented with measuring or predicting realistic exposure concentrations.

Closantel was the only tested compound that did not present a clear dose-response relationship neither on adult survival nor on the number of juveniles produced. Although significant effects were observed these were rather similar among the different doses tested and lower than 50% in relation to control. According to the VETERINARY SUBSTANCES DATA BASE (2011), there are no studies in the literature regarding closantel toxicity towards soil fauna, making the discussion of the obtained results difficult. Closantel belongs to the chemical group of salicylanides, which have an anti-parasitic action against arthropods and helminths (Guerrero et al., 1984). The mode of action of salicylanides, including closantel, has not been completely clarified. They act as uncouplers of oxidative phosphorylation in cell mitochondria, killing the parasites by disrupting the production of ATP (Junquera, 2007). Little is metabolized in the treated animal's body and approximately 80% of the administered

dose is excreted through its feces, with over 98% excreted in the molecule's original form (Junquera, 2007).

Based on our study it is possible to assume that some of the tested veterinary compounds, depending on their class and mode of action, are potentially toxic to soil collembolans (assessed using the standard collembolan test species *F. candida*) and possibly to other arthropod groups. These effects observed on reproduction could be directly linked to a low adult survival, particularly in the cases of fipronil and fluazuron, but not in the case of ivermectin. This was the only compound where there is a clear dose-effect relationship for reproduction while mortality is not significantly affected. Since the route of entry of these compounds into the environment are the excreta of treated animals, these results highlight the need for more extensive studies, aiming to evaluate the effects of these compounds when present in the fecal material of treated animals, i.e., testing the fecal material from treated animals. This assessment is important to have a more realistic perception of the potential effects of these compounds. Since they can bind strongly to the fecal material and remain in the feces until they are decomposed, their entry into the soil is, among other factors, dependent on the decomposition dynamics of the fecal material, influencing the effects they may exert towards soil fauna, which may not be immediately observed (Wall and Strong, 1987). These studies should be complemented by the measurement or the prediction of the soil concentration of these compounds under the dung pats in order to ascertain potential risks towards these non-target soil organisms.

2.1.6 References

- Adamski, Z., Bloszyk, J., Piosik, K., Tomczak, K., 2009. Effects of diflubenzuron and mancozeb on soil microarthropods. *Biological Lett.* 46, 3-13.
- Alves, P. R. L., Cardoso, E. J. B. N., Martines, A. M., Sousa, J. P., Pasini, A., 2014. Seed dressing pesticides on springtails in two ecotoxicological laboratory tests. *Ecotox. Environ. Safe.* 105, 65-71.
- Bai, S. H., Ogbourne, S., 2016. Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. *Chemosphere.* 154, 204-214
- Beynon, S. A., 2012. Potential environmental consequences of administration of anthelmintics to sheep. *Vet Parasitol.* 189, 113-124.
- Boxall, A. B. A., 2008. Fate of veterinary medicines applied to soils, in: Kümmerer, K. (Ed.), *Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects and risks*, Springer, Berlin, pp. 103-119.
- Canga, A. G., Prieto, A. M. S., Liébana, M. J. D., Martínez, N. F., Vega, M. S., Vieitez J. J. G., 2009. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *Vet. J.* 179, 25-37.
- Cooper, K. M.; McMahon, C.; Fairweather, I., Elliott, C.T., 2014. Potential impacts of climate change on veterinary medicinal residues in livestock produce: An island of Ireland perspective. *Trends Food Sci. Tech.* 44, 21-35.
- Diao, X., Jensen, J., Duus Hansen, A., 2007. Toxicity of the anthelmintic abamectin to four species of soil invertebrates. *Environ. Pollut.* 148, 514-519.
- Dourmishev, A. L., Dourmishev, L. A., Schwartz, R. A., 2005. Ivermectin: Pharmacology and application in dermatology. *Int. J. Dermatol.* 44, 981-988.
- EC - Environment Canada, 2005. Guidance document on statistical methods for environmental toxicity tests, Method development and applications section. Report EPS 1/RM/46, In: Environmental Protection Series. Environment Canada. Environmental Technology Centre, Ottawa, Ontario, 2005.
- FAO - Food And Agriculture Organization Of The United Nations, 2014. Residues of some veterinary drugs in animals and foods. <<http://www.fao.org/docrep/w8338e/w8338e00.htm#Contents>> (accessed 15.05. 2014).

- Floate, K. D., Wardhaugh, K. G., Boxall, A. B. A., Sherratt, T. N., 2005. Fecal residues of veterinary parasiticides: nontarget effects in the pasture environment. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 153-179.
- Garcia, M., 2004. Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. 291f. PhD Thesis - Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät, Universidade de Bonn.
- Geary, T. G., 2005. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Parasitology* 21, 530-532.
- Geary, T.G., Moreno, Y., 2012. Macrocyclic lactone anthelmintics: spectrum of activity and mechanism of action. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 866-872.
- Glancey, B. M., Lofgren, C.S., Williams, D.F., 1982. Avermectin B1a: Effects on the ovaries of red imported fire ant queens (Hymenoptera: Formicidae). *J. Med. Entomol.* 19, 743-747.
- Grisi, L., Leite, R. C., Martins, J. S., Barros, A. T. M., Andreotti, R., Cançado, P. H. D., León, A. A. P., Pereira, J. B., Villela, H. S., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23, 150-156.
- Guerrero, J. 1984. Closantel: A review of its antiparasitic activity. *Prev. Vet. Med.* 2, 317-327.
- Halley, B. A., Jacob, T. A., Lu A. Y. H., 1989. The environmental impact of the use of ivermectin - Environmental effects and fate. *Chemosphere.* 18, 1543-1563
- Horvat, A. J. M., Petrovic, M., Babic, S., Pavlovic, D. M., Asperger, D., Pelko, S., Mance, A. D., Kastelan-Macan, M., 2012. Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. *Trac-Trend Anal. Chem.* 31, 61-84.
- Hsiao, E. Y., Ho, W. H., Yen, J. H., 2013. Vertical distribution in soil column and dissipation in soil of benzoylurea insecticides diflubenzuron, flufenoxuron and novaluron and effect on the bacterial community. *Chemosphere.* 90, 380-386.
- ISO 11274, 1998. Soil quality - Determination of the water-retention characteristic - laboratory methods. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland
- ISO 10390, 2005. Soil quality - determination of pH. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

- ISO 11267, 1999. Soil Quality - Inhibition of Reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by Soil Pollutants. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Iwasa, M., Nakamura, T., Fukaki, K., Yamashita, N., 2005. Nontarget effects of ivermectin on coprophagous insects in Japan. *Environ. Entomol.* 34, 1485 - 1492.
- Jensen, J., Scott-Fordsmand, J.J., 2012. Ecotoxicity of the veterinary pharmaceutical ivermectin tested in a soil multi-species (SMS) system. *Environ. Pollut.* 171, 133-139.
- Jensen, J., Diao, X., Hansen, A.D., 2009. Single- and two-species tests to study effects of the anthelmintics ivermectin and morantel, and the coccidiostatic monensin on soil invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 316-323.
- Jensen, J., Krogh, P.H., Sverdrup, L.E., 2003. Effects of the antibacterial agent tiamulin, olaquinox and metronidazole and the anthelmintic ivermectin on the soil invertebrate species *Folsomia fimetaria* (Collembola) and *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae). *Chemosphere* 50, 437-443.
- Jochmann, R., Blanckenhorn, W. U., 2016. Non-target effects of ivermectin on trophic groups of the cow dung insect community replicated across an agricultural landscape. *Basic. Appl. Ecol.* 17, 291-299
- Junquera. P. Parasites of livestock, dogs and cats. <http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2391&Itemid=2654> (accessed 12. 03. 2016)
- Kreuzing, R., 2010. The Reference manure concept for transformation tests of veterinary medicines and biocides in liquid manure. *Clean - Soil, Air, Water* 38, 697-705.
- Liebig, M., Alonso, A., Blubaum-Gronau, E., Boxall, A. B., Brinke, M., Carbonell, G., Ege-ler, P., Fenner, K., Fernandez, C., Fink, G., Garric, J., Halling-Sørensen, B., Knacker, T., Krogh, K. A., Küster, A., Löffler, D., Porcel Cots, M. A., Pope, L., Prase, C., Römbke, J., Rönnefahrt, I., Schneider, M. K., Schweitzer, N., Tarazona, J. V., Ternes, T. A., Traunspurger, W., Wehrhan, A., Duis, K. 2010. Environmental risk assessment of ivermectin: A case study with a veterinary pharmaceutical. *Integr Environ Assess Manag.* 6, 567-587.

- Lumaret, J.-P., Alvinerie, M., Hempel, H., Schallnaß, H.-J., Claret, D., Rombke, J., 2007. New screening test to predict the potential impact of ivermectin-contaminated cattle dung on dung beetles. *Vet. Res.* 38, 15 - 24.
- Lumaret, J.-P., Errouissi, F., Floate, K. D., Rombke, J., Wardhaugh, K., 2012. A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 1004-1060.
- Maccari, A.P, Baretta, D., Paiano, D., Leston, S., Freitas, A., Ramos, F., Sousa, J.P., Klau-berg-Filho, O., 2016. Ecotoxicological effects of pig manure on *Folsomia candida* in subtropical Brazilian soils. *J. Hazard. Mater.* 314, 113-120.
- Mougin, C., Kollmann, A., Dubroca, J., Ducrot, P.H., Alvinerie, M., Galtier, P., 2003. Fate of veterinary medicine ivermectin in soil. *Environ. Chem. Lett.* 1, 131-134.
- Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Nagata, K., Yeh, J.Z., 2007. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Hum. Exp. Toxicol.* 4, 361-366.
- Perry, W.B., Christiansen, T.A., Perry S.A., 1997. Response of soil and leaf litter microarthropods to forest application of diflubenzuron. *Ecotoxicology* 6, 87-99.
- Prasse, C., Loffler, D., Ternes, T.A., 2009. Environmental fate of the anthelmintic ivermectin in an aerobic sediment/water system. *Chemosphere* 77, 1321-1325.
- Römbke, J., Krogh, K. A., Moser, T., Scheffczyk, A., Liebig, M., 2010. Effects of the veterinary pharmaceutical ivermectin on soil invertebrates in laboratory tests. *Arch. Environ. Con. Tox.* 58, 332-340.
- Sakuma, M., 1998. Probit analysis of preference data. *Appl. Entomol. Zool.* 33, 339-347.
- San Miguel, A., Raveton, M., Lempérière, G., Ravanel, P., 2008. Phenylpyrazoles impact on *Folsomia candida* (Collembola). *Soil. Biol. Biochem.* 40, 2351-2357.
- Sanchez-Bayo, F., 2011. Insecticides mode of action in relation to their toxicity to non-target organisms. *J. Environment. Analytic. Toxicol.* 4, 1-9.
- Sakuma, M., 1998. Probit analysis of preference data. *Appl. Entomol. Zool.* 33, 339-347.
- Scheffczyk, A., Floate, K. D., Blanckenhorn, W. U., Düring, R. A., Klockner, A., Lahr, J., Lumaret, J. P., Salamon, J. A., Tixier, T., Wohde, M., Römbke, J., 2016. Non-target effects of ivermectin residues on earthworms and springtails dwelling beneath dung of treated cattle in four countries. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 1959-1969.

- Shalaby, H. A., 2013. Anthelmintics Resistance; How to overcome it? *Iranian J. Parasitol.* 8, 18-32.
- SINDAN - Sindicato Nacional das Indústrias de Produtos para Saúde Animal, 2015. O setor: mercado. <<http://www.sindan.org.br>> (accessed 05. 03. 2016).
- Sommer, C., Steffansen, B., 1993. Changes with time after treatment in the concentration of ivermectin in fresh cow dung and in cow pats aged in the field. *Vet. Parasitol.* 48, 67-73.
- Sommer, C., Steffansen, B., Overgaard Nielsen, B., Grønvold, J., Jensen, K. M., Brøchner Jespersen, J., Springborg, J., Nansen, P., 1992. Ivermectin excreted in cattle dung after subcutaneous injection or pour-on treatment: Concentration and impact on dung fauna. *Bull. Entomol. Res.* 82, 257-264.
- StatSoft Inc, 2004. STATISTICA 7.0 Data Analysis Software System, version 7 <<http://www.statsoft.com>>.
- Tingle, C. C. D., Rother, J. A., Dewhurst, C. F., Lauer, S., King, W.J., 2003. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 176, 1-66 .
- University of Texas Health Science Center, 2002. UTHSCSA ImageTool 3.0. San Antonio.
- Vandewalle, M., Bello, F., Berg, M., Feld, C.K., Lavorel, S., Martins Da Silva, P., Moretti, M., Sousa, J.P., Santos, P., Sattler, T., Sykes, M.T., Woodcock, B.A., Niemelä, J., Bolger, T., Dubs, F., Vanbergen, A.J., 2010. Functional traits as indicators for monitoring biodiversity response to land use changes across ecosystems and taxa. *Biodivers. Conserv.* 19, 2921-2947.
- Verdú, J.R., Cortez, V., Ortiz, A.J., González-Rodríguez, E., Martínez-Pinna, J. Lumaret, J.P., Lobo, J.M., Numa, C., Sánchez-Piñero, F., 2015. Low doses of ivermectin cause sensory and locomotor disorders in dung beetles. *Scientific Reports.* 5, 1-10.
- VSDB - Veterinary Substances Data Base, 2011. Environmental Fate - Ecotoxicology - Human Health - A to Z Index. <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/1809.htm>> (accessed 28. 01. 2016).
- Wall, R., Strong, L., 1987. Environmental consequences of treating cattle with the antiparasitic drug ivermectin. *Nature* 327, 418-421.

Zhao, X., Yeh, J. Z., Salgado, V. L., Narahashi, T., 2004. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310, 192-201

Zhao, X., Yeh, J. Z., Salgado, V.L., Narahashi T., 2005. Sulfone metabolite of fipronil blocks gamma-aminobutyric acid- and glutamate-activated chloride channels in mammalian and insect neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 363-373.

Table 2.1 Ecotoxicological endpoints ($NOEC_{reprod}$, $LOEC_{reprod}$, EC_{50} and LC_{50}) derived for reproduction data of *Folsomia candida* exposed to the four different compounds assessed.

Parameters	Active ingredient (mg kg ⁻¹ dry soil)			
	Fipronil	Ivermectin	Fluazuron	Closantel
$NOEC_{reprod}$	<0.3	<0.2	0.3	0.5
$LOEC_{reprod}$	≤0.3	≤0.2	0.8	2.0
EC_{50} (CL _{95%})	0.19 (0.16 - 0.22)	0.43 (0.09 - 0.77)	3.07 (2.26 - 3.87)	>18*
LC_{50} (CL _{95%})	0.62 (0.25 - 1.06)	>10	2.15 (CL _{95%} : n.d.)	>18

* not calculated due to the absence of effects higher than 50%.

Figures

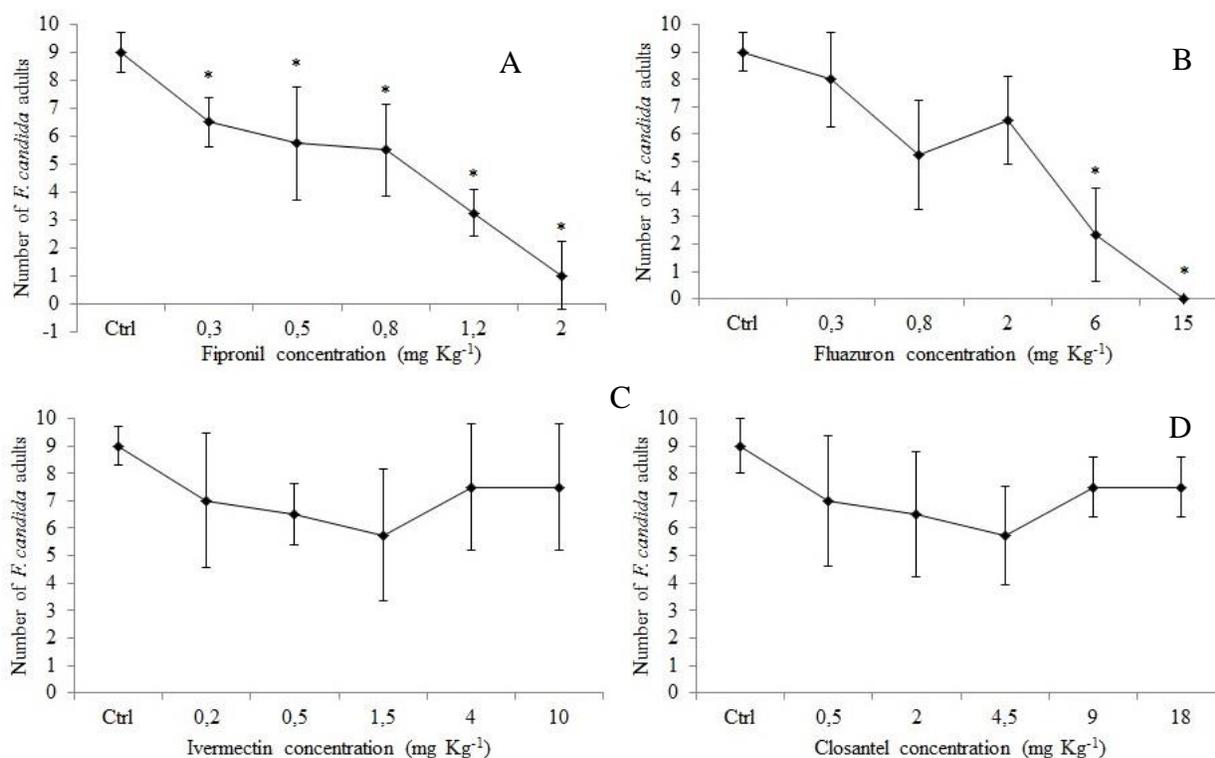


Figure 2.1 - Survival of *F. Candida* springtails (10 age-synchronized organisms) when exposed for 28 days to soil spiked with increasing doses of fipronil (A), fluazuron (B), ivermectin (C) and closantel (D). Asterisks indicate significant reduction in the number of adults in relation to the control treatment (one-way ANOVA, Dunnett test - $P < 0.05$). (⊖) standard deviation ($n = 5$).

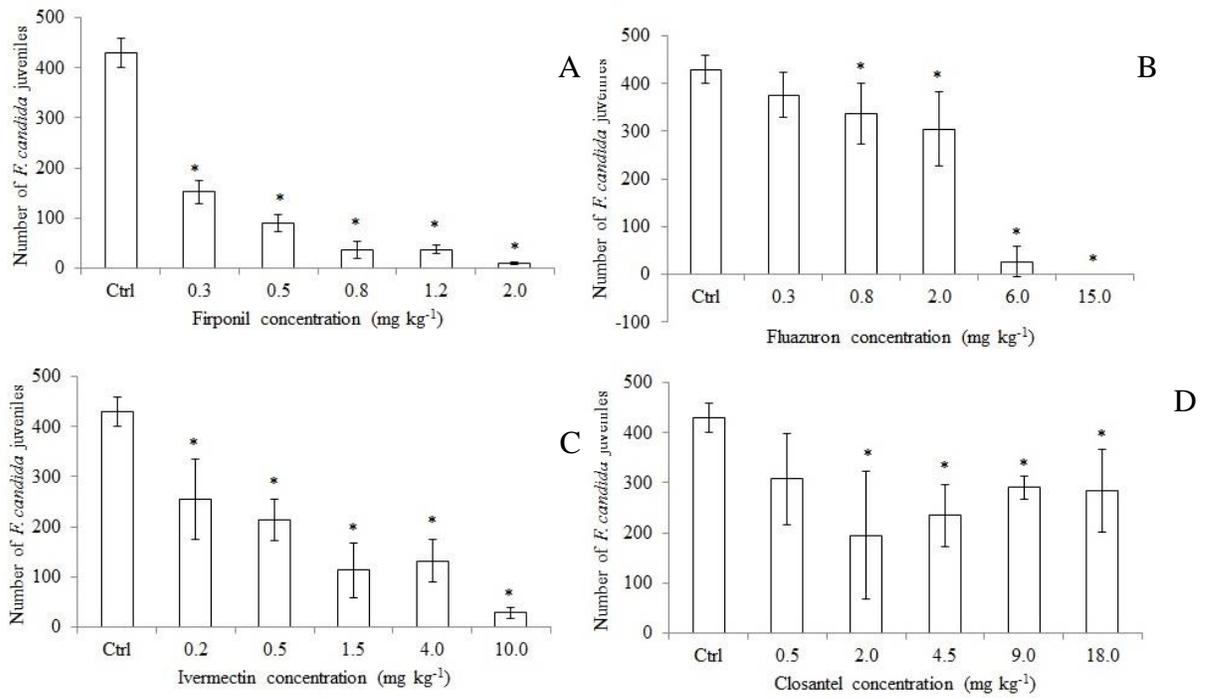


Figure 2.2 - Average of juveniles *F. Candida* in Tropical Artificial Soil (SAT) spiked with increasing doses of fipronil (A), ivermectin (B), fluazuron (C) and closantel (D). Asterisks indicate significant reduction in the number of juveniles in relation to the control treatment (one-way ANOVA, Dunnett test - $P < 0.05$). (τ) standard deviation ($n = 5$).

2.2 MANUSCRITO II - Efeitos ecotoxicológicos de medicamentos veterinários sobre organismos edáficos em solos tropicais

De acordo com normas para publicação em:
Revista Brasileira de Ciência do Solo

2.2.1 RESUMO

Medicamentos veterinários utilizados para o tratamento e prevenção de doenças em animais representam importantes fontes de poluição ambiental, uma vez que chegam ao ambiente terrestre através das fezes e urina depositadas na superfície do solo. Neste estudo foram avaliados os efeitos do medicamento veterinário comercial fipronil e dos fitoterápicos torta e extrato de nim, sobre parâmetros de sobrevivência e reprodução de minhocas *Eisenia andrei*, enquitreídeos *Enchytraeus crypticus* e colêmbolos *Folsomia candida*, em Latossolo Vermelho distrófico (LVd) e um substrato artificial (SAT). As doses de fipronil, torta de nim e extrato de nim testadas foram distintas para os organismos. Os ensaios foram conduzidos conforme metodologias padronizadas pela ISO, para cada ensaio foram utilizadas cinco réplicas em delineamento inteiramente casualizado. O fipronil foi a molécula que desencadeou maiores efeitos tóxicos, especialmente para colêmbolos, com valores de EC_{50} de $0,26 \text{ mg kg}^{-1}$ (IC $0,18 - 0,35 \text{ mg kg}^{-1}$) para LVd e $0,29 \text{ mg kg}^{-1}$ (IC $0,22 - 0,37 \text{ mg kg}^{-1}$) para o SAT. Nos ensaios com minhocas e enquitreídeos o fipronil não causou efeitos suficientes para calcular o EC_{50} , apenas foram observadas reduções em comparação ao controle no número de juvenis de *E. andrei* e de adultos de *E. crypticus* na dose de 10 mg kg^{-1} . Já os compostos a base de nim não apresentaram efeitos de toxicidade para minhocas e enquitreídeos, apenas foi observado redução no número de colêmbolos juvenis quando da aplicação de torta de nim nas doses de 500 e 1.000 mg kg^{-1} . Esses resultados apresentam novas perspectivas sobre a toxicidade de medicamentos veterinários utilizados no controle de parasitas, que são de grande importância uma vez que a busca por sistemas produtivos que não agredem o meio ambiente, a qual é primordial para a manutenção das atividades agropecuárias e a produção animal sustentável.

Palavras chave: fipronil, *Azadiractha indica*, colêmbolos, minhocas, enquitreídeos

2.2.2 ABRSTRACT

Veterinary medicines used for the treatment and prevention of diseases in animals represent important sources of environmental pollution, as they reach the terrestrial environment through feces and urine deposited on the surface of the soil. In this study, the effects of the commercial veterinary medicinal product fipronil and the phytotherapics cake and extract of neem, on survival and reproduction parameters of *Eisenia andrei* earthworms, *Enchytraeus crypticus* enchytraeids and *Folsomia candida* springtails, on Oxsoil (LVd) and tropical artificial substrate (TAS). The doses of fipronil, neem cake and neem extract tested were distinct for the organisms. The tests were conducted according to standardized methodologies by ISO, for each test five replicates were used in a completely randomized design. Fipronil was the molecule that triggered major toxic effects, especially for springtails, with EC_{50} values of 0.26 mg kg^{-1} ($0.18\text{-}0.35 \text{ mg kg}^{-1}$) for LVd and 0.29 mg kg^{-1} ($0.22 - 0.37 \text{ mg kg}^{-1}$) for SAT. In the earthworms and enchytraeids trials, fipronil did not cause sufficient effects to calculate the EC_{50} , only reductions in were observed in the number of juveniles of *E. andrei* and adults of *E. crypticus* at the dose of 10 mg kg^{-1} . However, the neem-based compounds did not present toxicity effects for earthworms and enchytraeidae, only a reduction in the number of juvenile springtails was observed when applying neem cake at doses of 500 and 1,000 mg kg^{-1} . These results present new perspectives on the toxicity of veterinary drugs used in the control of parasites, which are of great importance since the search for productive systems that do not harm the environment, which is paramount for the maintenance of agricultural activities and production sustainable animal.

Keywords: fipronil, *Azadirachta indica*, springtails, earthworms, enchytraeidae

2.2.3 INTRODUÇÃO

A utilização de medicamentos veterinários para combater doenças e promover a produção animal é uma prática cada vez mais comum na pecuária intensiva (Kummerer, 2010; Arnold et al., 2013). Por isso, nos últimos anos estes compostos têm sido reconhecidos como contaminantes emergentes devido à ocorrência disseminada no meio ambiente (Brooks et al., 2007), dando origem a preocupações quanto ao seu impacto ambiental (Santos et al., 2010; Di Nica et al., 2015). Grande parte dos medicamentos veterinários utilizados nos bovinos para controle de parasitos são pouco absorvidos, sendo que 90% do composto ativo ou seus metabólitos podem ser excretados (Jones et al., 2003; Tolls, 2011). A principal entrada no ambiente se dá através de dejetos utilizados como fertilizantes, e a defecação direta em áreas de pastagens, ocasionando a persistência destes compostos por longos períodos no solo (Förster et al., 2009; Zhang et al., 2016).

A presença de medicamentos veterinários nos dejetos que são aplicados no solo são capaz de afetar os organismos não alvos, que são responsáveis, juntamente com o intemperismo pela decomposição do esterco nas pastagens e ciclagem de nutrientes, de forma que apresentam ação funcional e economicamente importante no sistema (Wall e Beynon, 2012; Beynon, 2012; Lumaret et al., 2012). Os efeitos podem ter reflexos dentro de uma cadeia hierárquica biológica, seja a nível de células, de organismos, de população e de ecossistema (Bártíková et al., 2016). De acordo com as diretrizes atuais sobre avaliação de risco ambiental na União Europeia, o risco dos medicamentos veterinários para os organismos do solo tem que ser avaliado através de dados experimentais sobre o destino e os efeitos do fármaco (Liesse e Beketov, 2011). Assim, a ecotoxicologia terrestre é uma alternativa para a compreensão dos efeitos de curto e longo prazo de substâncias químicas sobre os organismo e ecossistemas edáficos (Kuperman et al., 2009).

Os invertebrados do solo possuem características importantes para manter a qualidade do solo, uma vez que são organismos-chave na decomposição de material orgânico, liberação de nutrientes e desempenham um papel importante na formação de micro e macroestrutura do solo (Botinelli et al., 2015). Os organismos amplamente utilizados como bioindicadores de qualidade de solo são as minhocas, os colêmbolos e os enquitreídeos, por se destacarem entre os principais organismos utilizados em testes de ecotoxicidade terrestre, visto que possuem fácil adaptação em laboratório, ciclos de vida relativamente curtos (Fountain e Hopkin,

2005; Jänsch et al., 2006) e sensibilidade aos poluentes (Greenslade e Vaughan, 2003; Havlicek, 2012).

Dentre os medicamentos chamados de “nova geração”, utilizados no controle de parasitos externos em bovinos, destaca-se o fipronil por possuir amplo espectro e de liberação lenta (Gunasekara e Troung, 2007). Embora a molécula de fipronil seja largamente utilizada em diversos países, inclusive no Brasil (Oliveira, 2010), na Europa seu uso proibido devido ao elevado grau de toxicidade aos organismos não alvos (Stevens et al., 1998). Por isto, tornou-se necessário estudar os efeitos desta molécula dentro da produção animal e no controle de carrapatos. Assim, a busca por métodos mais seguros e menos agressivos ao homem e ao ambiente, vem estimulando o uso de inseticidas com procedências naturais e os acaricidas a base de extrato vegetal (Broglio-Micheletti et al., 2010). Algumas técnicas menos agressivas ao meio ambiente vem sendo utilizadas no controle de parasitos, dentre estas, destaca-se o uso de extratos vegetais. O nim indiano (*Azadirachta indica*) é uma alternativa e possui efeito acaricida sobre os carrapatos (Silva et al., 2008), porém pouco se sabe sobre suas características no ambiente terrestre.

A hipótese do trabalho está baseada em que a toxicidade do fipronil será maior aos organismos, enquanto os compostos fitoterápicos naturais apresentam menores efeitos aos organismos testes. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos na sobrevivência e reprodução de três organismos bioindicadores de qualidade do solo (colêmbolos, minhocas e enquitreídeos) quando expostos a doses crescentes de um composto químico a base de fipronil, e dois compostos fitoterápicos a base de nim utilizados no controle de parasitos em bovinos.

2.2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.4.1 Solo teste

Foram utilizados dois solos para a realização dos ensaios ecotoxicológicos, sendo um solo natural representativo em diversas regiões do Brasil, classificado como Latossolo Vermelho distrófico (LVd) com textura argilosa, de acordo com USDA (United States Department of Agriculture, 2014). Este foi coletado na camada superficial de 0 - 20 cm em uma área de floresta sem histórico de aplicação de pesticidas ou atividade pecuária, no município

de Chapecó, SC (27°05'274''S e 052°38'085''W). O solo foi seco em estufa de circulação forçada a uma temperatura de 65 °C e tamisado em peneira de 2 mm para a separação de fragmentos grosseiros (pedras, raízes e restos vegetais).

Além do solo natural foi utilizado o Solo Artificial Tropical (SAT), que é uma adaptação do solo OECD proposto por Garcia (2004), e consiste em uma mistura de 75% de areia fina, 20% de caulim e 5% de fibra de coco. Os ingredientes foram misturados de forma homogênea e posteriormente o pH foi corrigido com CaCO₃ para que o valor se mantivesse entre 5,5 e 6,5. Foi realizada a mensuração da capacidade máxima de retenção de água (CRA) e a correção da umidade para 65% da CRA máxima. Os parâmetros físicos e químicos dos solos utilizados nos ensaios estão apresentados na Tabela 2.2.

2.2.4.2 Organismos teste

Os organismos testes foram escolhidos por fazer parte de uma lista de bioindicadores utilizados em ensaios ecotoxicológicos terrestres (ISO 11267 (1999); 11268-2 (1998); 16387 (2004)). Foram utilizadas minhocas da espécie *Eisenia andrei* (Lumbricidae) e na montagem dos ensaios todos organismos com clitelo aparente e peso padrão entre 250-600 mg. Os enquitreídeos eram da espécie *Enchytraeus crypticus* (Lumbricidae) e para a montagem dos ensaios apresentavam clitelo aparente. E os colêmbolos utilizados eram da espécie *Folsomia candida* (Isotomidae) e na montagem dos ensaios estavam sincronizados com idade de 10-12 dias. Os meios de culturas todas as espécies eram mantidos em condições ambientais padrão, onde a temperatura foi mantida em 20 °C (± 2 °C), com fotoperíodo 12:12 horas (luz:escuro).

2.2.4.3 Substâncias teste

Foram testados três medicamentos utilizados para o controle de parasitos externos em bovinos, sendo dois de origem fitoterápica, a torta e o extrato de nim, e outro de origem sintética a base de fipronil. Os medicamentos a base de nim apresentavam duas formas e as doses foram determinadas a partir da concentração da substância com maior efeito inseticida a *Azadiractina indica*. A torta de nim apresentava em sua composição aproximadamente 2,5% de *A. indica* e as doses utilizadas nos ensaios ecotoxicológicos foram 0; 5; 10; 20; 40; 80; 200; 500 e 1.000 mg kg⁻¹ de solo. O extrato de nim de forma mais concentrada apresenta

aproximadamente 38% de *A. indica* e foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich com elevado grau de pureza (99,7%), sendo as doses utilizadas nos ensaios ecotoxicológicos de 0; 1,5; 3; 7; 15; 35; 70 e 140 mg kg⁻¹.

O fipronil testado foi advindo de um medicamento comercial Top Line - Merial®, com concentração de 5%. No entanto, para os testes a quantidade aplicada no solo foi referente ao princípio ativo. As doses utilizadas foram 0; 0,25; 0,50; 1; 2 e 5 mg kg⁻¹, nos testes com enquitreídeos e minhocas e 0; 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,15; 0,30; 0,60 e 1 mg kg⁻¹ nos ensaios com colêmbolos. Por ser um medicamento com características hidrofóbicas foi necessário realizar sua diluição em um solvente orgânico (acetona). O processo de diluição consistiu em aplicar a quantidade de substância referente a cada dose em uma porção de 25 mL de acetona para cada 100 gramas de solo. Após a homogeneização o material foi mantido em uma câmara de exaustão por 24 horas até completa evaporação da acetona e ao final do processo foi adicionada a água referente a 65% da capacidade máxima de retenção de campo e prosseguiu a montagem do ensaio, na condução do ensaio foi utilizado um tratamento de controle solvente, somente acetona..

2.2.4.4 Testes com colêmbolos *F. candida*

Os testes com colêmbolos *F. candida* foram baseados no protocolo ISO 11267 (1999), com duração de 28 dias. Cada amostra experimental consiste de um pote de plástico (diâmetro: 3,5 cm; altura: 11,5 cm) preenchido com 30 g de solo. Cada repetição recebeu 10 colêmbolos juvenis (10-12 dias de idade). No primeiro dia do teste e após 14 dias os organismos foram alimentados com aproximadamente 2 mg de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*). Semanalmente os frascos eram abertos para aeração e para correção da umidade.

Os testes tinham duração de 28 dias, onde o conteúdo do pote era esvaziado para outro recipiente no qual foi adicionada água e algumas gotas de tinta preta. Após uma agitação suave os indivíduos vivos flutuarão na superfície, os adultos foram contados e os recipientes fotografados para posterior contagem utilizando do software ImageTool (University of Texas Health Science Center, 2002).

2.2.4.5 Testes com minhocas *E. andrei*

O teste de reprodução foi conduzido com base no protocolo ISO 11268-2 (1998), com duração total de 56 dias. Foram utilizados potes de plásticos com aproximadamente 200 cm² contendo 500 g de solo com as respectivas doses avaliadas. Em cada pote foram acondicionadas 10 minhocas da espécie *Eisenia andrei* adultas e com peso entre 250 e 600 mg.

As minhocas receberam alimento no início do teste e a cada 14 dias era fornecido 5 g de esterco úmido de equino, sem histórico de utilização de medicamentos e com dieta baseada em pastagem. O esterco foi desfaunado por ciclos de congelamento e descongelamento, conforme descrito por Segat (2015).

Após 28 dias do início dos ensaios, as minhocas adultas foram retiradas e contabilizadas e o solo com os casulos foi recolocado nos potes e incubados por mais 28 dias até a eclosão. Ao final do teste os potes de plásticos foram colocados em banho-maria a 60 °C por 30-40 minutos para forçar a migração dos juvenis até a superfície do solo, transferidos para uma placa de Petry e contabilizados.

2.2.4.6 Testes com enquitreídeos *E. crypticus*

O teste para determinar a reprodução e sobrevivência em *E. crypticus* seguiu o protocolo padronizado da ISO 16387 (2004). Por apresentar tamanho pequeno e curto ciclo reprodutivo, o ensaio teve duração de 28 dias (Chelinho et al., 2011). Cada unidade experimental consistiu em um recipiente (diâmetro: 3 cm; altura: 5 cm), contendo 30 g de solo e a respectiva concentração a ser avaliada. Os organismos foram alimentados com 5 mg de flocos de aveia moído e esterelizada, e o fornecimento foi fracionado em duas vezes, no início do experimento e aos 14 dias.

Ao final do teste, o número de enquitreídeos foi avaliado após fixação com álcool etílico, colorindo com rosa Bengala (solução de 1% com etanol) e peneiragem úmida (malha 75 mm), os indivíduos adultos foram contabilizados quando havia a presença do clitelo.

2.2.4.7 Análise estatística

Os dados de sobrevivência e reprodução dos organismos testados foram submetidos a análise de variância (ANOVA One-way) seguida pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$), utilizando

o Software Statistica 7.0 (Statistica, 2004). Antes da análise foram verificadas a normalidade e a homocedasticidade dos dados através de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Quando estes pressupostos não foram cumpridos os dados foram transformados log X. Os valores de EC₅₀ (Concentração estimada para causar um ou mais efeitos específicos capazes de afetar 50% dos organismos), foram calculados utilizando o modelo Logístico não linear, além disso, o NOEC (Concentração de efeito não observado) e LOEC (Menor concentração de efeito observado) também foram estimados a partir do Software Statistica 7.0.

Os valores de LC₅₀ (Concentração estimada para causar 50% de mortalidade) dos testes de sobrevivência foram estimados a partir do Software PriProbit® 1.63 (Sakuma, 1998).

2.2.5 RESULTADOS

2.2.5.1 Validação dos testes ecotoxicológicos

Todos os testes cumpriram os critérios de validação estabelecidos pela ISO referente a cada organismo. Os testes realizados com minhocas *E. andrei* apresentaram critérios validos pela ISO 11268-2 (1998), onde o número de juvenis por replica do controle foi superior a 30 indivíduos, o coeficiente de variação no controle não excede 30% e a percentagem de mortalidade dos adultos foi inferior a 10% para todos os ensaios em ambos dos solos (Tabela 2.3).

Para os ensaios com *E. crypticus* foram atendidos os critérios de validação, onde a mortalidade de adultos no controle foi inferior a 20% com presença de mais de 25 juvenis por réplica do controle e coeficiente de variação no controle inferior a 50%, exceto a mortalidade que foi acima de 20% para extrato de nim em LVd e SAT. Os dados para cada substância e tipo de solo estão apresentados na Tabela 2.4.

Os ensaios com colêmbolos *F. candida* também foram validados de acordo com a ISO 11267 (1999), onde a mortalidade de adultos no controle não foi superior a 20%, o número de indivíduos juvenis nas réplicas do controle foram superiores a 100 indivíduos e o coeficiente de variação do número de juvenis não excedeu 30%, em todos os ensaios com os compostos e em ambos os solos (Tabela 2.5).

A utilização de acetona como solvente para o fipronil não causou efeito na sobrevivência de adultos e no número de juvenis de nenhum dos organismos testados em ambos dos solos. O

valor de P ($p \geq 0,05$) não foi significativo para todos os ensaios, indicando que não existem diferenças entre o controle e controle-solvente, assim o solvente não interferiu no teste.

2.2.5.2 Ensaios de sobrevivência e reprodução com *Eisenia andrei*

O aumento das doses de extrato de nim (Anexo 2.1A e 2.1B) e torta de nim (Anexo 2.2A e 2.2B), não afetou a sobrevivência e a reprodução de minhocas *E. andrei* ($p > 0,05$) para ambos os solos testados. Apenas na dose 15 mg kg^{-1} de extrato de nim em LVd houve redução em relação ao controle, já nas doses seguintes não foi observado redução. Este efeito é decorrente, provavelmente, a algum erro experimental, uma vez que os experimentos envolvendo organismos vivos são passíveis deste tipo de alteração.

Nos resultados com minhocas envolvendo doses crescentes do fármaco comercial fipronil não foram observadas reduções no número de adultos e juvenis em LVd (Figura 2.3A), porém houve redução no número de juvenis em relação ao controle na maior dose testada de fipronil em SAT. O NOEC foi a dose de 5 mg kg^{-1} e o LOEC 10 mg kg^{-1} (Figura 2.3B), não apresentando redução suficiente para calcular o valor de EC_{50} .

2.2.5.3 Ensaios de sobrevivência e reprodução com *Enchytraeus crypticus*

Nos testes com *E. crypticus* com os compostos extrato de nim e torta de nim não foi observada redução no número de adultos e juvenis em relação ao controle para nenhum dos solos avaliados (Anexos 2.3 e 2.4). Para o fármaco comercial fipronil aplicado no LVd não houve redução de adultos e juvenis (Figura 2.4A), já para o SAT foi observada redução dos adultos em relação ao controle na dose de 10 mg kg^{-1} (Figura 2.4B). O valor do NOEC foi de 5 mg kg^{-1} e do LOEC 10 mg kg^{-1} , não ocorrendo redução suficiente para calcular o valor de LC_{50} .

2.2.5.4 Ensaios de sobrevivência e reprodução com *Folsomia candida*

A aplicação de doses crescentes de extrato de nim tanto em LVd e SAT não promoveu redução significativa de adultos e juvenis de *F. candida* ($p > 0,05$) (Anexo 2.5A e 2.5B). Da mesma forma o LVd contaminado com doses crescentes de torta de nim não reduziu número de adultos e juvenis em relação ao controle (Figura 2.5A). No SAT não houve redução

no número de adultos, porém foi possível verificar redução no número de juvenis na dose de 500 mg kg⁻¹ (Figura 2.5B), sendo o valor de NOEC 200 mg kg⁻¹ e LOEC 500 mg kg⁻¹.

A contaminação do solo com o fármaco fipronil apresentou elevada redução no número de indivíduos adultos e juvenis de *F. candida* em ambos dos solos avaliados. Para LVd houve redução significativa no número de adultos, sendo o valor de NOEC 0,30 mg kg⁻¹ e LOEC 0,60 mg kg⁻¹, no entanto a redução não foi suficiente para calcular o LC₅₀. O número de juvenis também apresentou redução significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle, onde os valores de NOEC e LOEC foram 0,15 e 0,30 mg kg⁻¹, respectivamente (Figura 2.6A). O valor estimado de EC₅₀ foi de 0,26 mg kg⁻¹ (IC 0,18 - 0,35 mg kg⁻¹). Em SAT também houve redução no número de adultos, onde o valor de NOEC e LOEC foram 0,60 mg kg⁻¹ e 1 mg kg⁻¹, respectivamente, e o valor estimado de LC₅₀ foi de 0,48 mg kg⁻¹. Já o número de juvenis foi reduzido significativamente onde o valor de NOEC foi 0,15 mg kg⁻¹, LOEC 0,30 mg kg⁻¹ (Figura 2.6B) e o valor estimado de EC₅₀ foi de 0,29 mg kg⁻¹ (IC 0,22 - 0,37 mg kg⁻¹).

2.2.6 DISCUSSÃO

A aplicação de fipronil no solo apresentou resultados toxicidade principalmente para colêmbolos, enquanto o nim não foi tóxico suficiente para reduzir a reprodução dos organismos. Confirmando assim a hipótese do nosso trabalho, pois os efeitos tóxicos foram maiores para colêmbolos, e menos tóxicos para enquitreídeos e minhocas. Além disso, também destaca-se uma tendência de maior toxicidade no SAT, que possuía característica mais arenosa quando comparado com o LVd.

A torta de nim e o extrato de nim têm como componente principal azadirachtina, por sua vez, essa substância funciona como um regulador de crescimento e interfere na ecdise dos insetos, além de inibir a alimentação e reprodução (Schumutterer, 1990; Tanzubil e McCaffery, 1990). No entanto, os efeitos da torta de nim sobre os colêmbolos foram observados apenas quando aplicado acima de 500 mg kg⁻¹ no SAT. Resultados semelhantes foram encontrados por Stark (1992), ao avaliar o extrato de nim com aplicação equivalente a 51 g de azadiractina por hectare. O autor verificou redução de 50% de colêmbolos da família Sminthuridae em comparação a área controle até 8 semanas após a aplicação do inseticida, enquanto colêmbolos das famílias Entomobryidae e Onychiuridae pareceram não se diferir

do controle. As possíveis causas para a redução da reprodução dos colêmbolos dentem-se no modo de ação do composto azadirachtina presente em grande quantidade no nim, que além de apresentar-se como regulador de crescimento, inibe significativamente a atividade enzimática da Acetilcolinesterase (AChE) (Grundy e Still, 1985; Ryan e Byrne, 1988; Miyazawa et al., 1997; Keane e Ryan, 1999; Nathan et al., 2008; Rattan, 2010). Essa é uma enzima chave responsável para a terminação do impulso nervoso por catalisar a hidrólise de neurotransmissores no sistema nervoso (Wang et al., 2004) e em invertebrados observa-se relação direta entre mudanças na atividade de AChE e toxicidade (Day e Scott, 1990; Sturm e Hansen, 1999).

Apesar da observação de redução de colêmbolos nesse experimento, as doses de efeito tóxico apresentavam quantidades significativamente maiores que as recomendadas no uso na agricultura sendo 12,5 e 25 mg kg⁻¹ de azadiractina nas concentrações de 500 e 1.000 mg⁻¹ de torta de nim, respectivamente. Uma vez que, a dose recomendada de azadiractina para controle de pragas na agricultura é de 0,25-0,30 L ha⁻¹, equivalente á 0,15 mg kg⁻¹ (Akca et al., 2009; Sarawaneeyaruk et al., 2015). Já dentro da produção animal, quando a torta de nim é fornecida no alimento, não se sabe exatamente a quantia que é excretada via fezes, contudo existem estudos que detectaram que a administração oral de compostos com nim em sua formulação é capaz de reduzir a eclosão de ovos de moscas no bolo fecal desses animais, comprovando a presença e eficácia de resíduos na excreta (Miller e Chamberlain, 1989). Deste modo, estudos que avaliem a excreção do nim deve ser desenvolvidos para verificar os possíveis efeitos desses compostos nas fezes dos animais.

Para minhocas e enquitreídeos não foi observado toxicidade da torta e do extrato de nim. Muangphra e Gooneratne (2011) verificaram que altas concentrações de nim (116,27 mg L⁻¹), 35 vezes mais elevadas que a taxa de aplicação recomendada como inseticida não foi genotóxico para minhocas *Pheretima peguana*. Além disso, os autores afirmam que altas concentrações de nim podem ser estressantes, no entanto, as minhocas tendem a se adaptar mudando a morfometria dos caracteres de tecidos, incluindo a epiderme, parede do corpo e epitélio intestinal. Kumar et al. (2015) afirmam ainda que, o inseticida a base de quercetina/azadiractina tem efeito positivo sobre minhocas *Eutyphoeus orientalis*, de modo que reflete em uma taxa de sobrevivência mais elevada e maior fecundidade quando em baixas concentrações. Kreutzweiser et al. (2011) ao avaliarem a concentração foliar de azadiractina so-

bre organismos decompositores, dentre eles minhocas, não observaram nenhum efeito adverso nem mesmo na maior dose testada (6 mg kg^{-1} foliar), concentração 30 vezes acima da esperada em campo. Nos dados encontrados na literatura apenas Mikunthan e Piratheban (2006) registraram efeito supressivo do nim em conjunto com dejetos de bovinos em minhocas da espécie *Eisenia foetida*, que apresentaram ganho de peso inferior e após 45 dias de exposição começaram a reduzir o peso, mas sem apresentar efeitos de mortalidade.

A presença do fipronil no solo indicou toxicidade mais evidente quando comparado com nim, principalmente nos colêmbolos, já para minhocas e enquitreídeos a redução foi apenas nas maiores doses 10 mg kg^{-1} no SAT. O fipronil é um potente inibidor dos receptores do ácido γ -aminobutírico (GABA) associados aos canais de cloreto nos insetos (Cole et al., 1993; Tingle et al., 2003; Martins, 2009) e sua molécula inibe não competitivamente o GABA (ácido γ -aminobutírico), se fixando ao receptor no interior do canal de cloro, impedindo o fluxo celular dos íons e anulando assim o efeito neuroregulador do GABA (Sartor e Santarém, 2006), causando a morte nos insetos por hiperexcitação e paralisia (Aajoud et al., 2003; Bobe et al., 1998; Gant et al., 1998; Zhao et al., 2004).

A toxicidade para colêmbolos da espécie *F. candida* foi elevada, uma vez que houve redução tanto na sobrevivência quanto na reprodução em ambos os solos testados. Nesse trabalho não foi possível estimar o valor de LC_{50} para o LVd, já o LC_{50} de SAT foi $0,48 \text{ mg kg}^{-1}$, esse resultado foi muito próximo ao encontrado por Zortéa et al. (2017), onde o valor de LC_{50} pra fipronil foi $0,62 \text{ mg kg}^{-1}$ ($0,25-1,06 \text{ mg kg}^{-1}$), utilizando o mesmo medicamento, ao contrário destes resultados Alves et al. (2014) ao avaliar o efeito de um inseticida utilizado no tratamento de sementes a base de fipronil encontraram um valor de LC_{50} bem superior sendo de $59,62 \text{ mg kg}^{-1}$ (IC: $30,99 - 88,25 \text{ mg kg}^{-1}$). Para os resultados com o número de juvenis, o valor de NOEC e LOEC encontrados no presente estudo foi de $0,15$ e $0,30 \text{ mg kg}^{-1}$ respectivamente, para ambos dos solos. Resultados semelhantes foram encontrados por San Miguel et al. (2008) testando concentrações crescentes de fipronil em solo OECD, os quais verificaram redução significativa na reprodução de colêmbolos *F. candida* a partir da dose de $0,33 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo seco. Diferente dos encontrados por Alves et al. (2014) que mostraram NOEC e LOEC inferiores, sendo $0,06$ e $0,12 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente.

Para os testes de reprodução os valores de EC_{50} neste estudo são muito semelhantes entre os solos, sendo $0,26 \text{ mg kg}^{-1}$ (IC: $0,18 - 0,35 \text{ mg kg}^{-1}$) para LVd e $0,29 \text{ mg kg}^{-1}$ ($0,22 -$

0,37 mg kg⁻¹) para SAT. Resultados parecidos foram relatados por San Miguel et al. (2008), que encontraram declínios significativos de 50% do número de juvenis de *F. candida* (EC₅₀) em concentrações de fipronil entre 0,33 e 0,50 mg kg⁻¹ solo, enquanto Alves et al. (2014) relataram valor de EC₂₀ (20% de redução na reprodução) de 0,12 mg kg⁻¹. Walker et al. (2016), após três dias da aplicação de 1,25 g ha⁻¹ (de ingrediente ativo de fipronil), perceberam mudanças significativas na comunidade de invertebrados do solo, com uma redução de 11.835 para 2.548 indivíduos, impulsionadas principalmente pelas reduções em Formicidae, Orthoptera, Coleoptera e Collembola, que por sua vez representava 16%, ou seja, de 1.894 foi reduzido à 408 indivíduos.

A diferença nos níveis de toxicidade entre adultos e juvenis de *F. candida* pode estar ligada a fatores como fase de desenvolvimento dos colêmbolos, uma vez que os efeitos podem ser mais evidentes nos juvenis do que em adultos (San Miguel et al., 2008). Além disso, também podemos atribuir diferenças na toxicidade em função do tipo de solo, o que justifica os efeitos observados nas minhocas e enquitreídeos apenas no SAT. Por outro lado, nos solos naturais o elevado conteúdo orgânico e de argila provavelmente teve uma alta capacidade de adsorção e, portanto, levou a uma redução na toxicidade do fipronil para minhocas e enquitreídeos (Amorim et al., 2002). Solos naturais, quando comparados com substratos artificiais possuem diferentes propriedades físicas e químicas, como pH, capacidade de troca de cátions entre outras, que podem influenciar diretamente na biodisponibilidade dos contaminantes e, portanto, na sua toxicidade, de modo que, a avaliação em solos naturais apresenta maior relevância ecológica em ensaios ecotoxicológicos (Natal Da Luz et al., 2008; Nunes e Espíndola, 2012).

Na literatura os efeitos tóxicos do fipronil sobre enquitreídeos não são encontrados e em minhocas são pouco evidenciados. Mostert et al. (2002) indicaram o efeito não tóxico de fipronil sobre a sobrevivência de minhocas do gênero *Pheretima*, sendo o valor de NOEC > 8.550 mg kg⁻¹ em solo artificial (SAT). Alves et al. (2013) também não verificaram reduções na sobrevivência de minhocas *E. andrei* até a concentração de 1.000 mg kg⁻¹, porém a reprodução foi reduzida tendo o valor estimado de EC₂₀ 23,16 mg kg⁻¹ (IC: 15,49 - 61,81 mg kg⁻¹). Os mesmos autores observaram a preferência desses organismos ao solo contaminado no ensaio de fuga em concentrações até 10 mg kg⁻¹, a provável causa de preferência é a incapacidade dos quimiorreceptores detectar o contaminante (Torkhani e Erzen, 2011). Qin et al.

(2015) estudaram os efeitos dos enantiômeros do fipronil (racemato fipronil, S-fipronil e R-fipronil), na sobrevivência de *Eisenia foetida*, e verificaram que em concentrações de 50-1000 mg kg⁻¹ não houve mortalidade, porém as minhocas tiveram o peso corporal reduzido e seu crescimento foi inibido. Em alguns casos, estas reduções poderiam ter sido causadas por mudanças nos processos fisiológicos ou bioquímicos de *E. foetida*, o que resultou na baixa ingestão de alimentos e no metabolismo reduzido (Ribeiro et al., 2001).

Contudo, o primeiro passo para avaliar os efeitos em organismos não-alvo de resíduos de medicamentos veterinários é a realização de bioensaios com espécies específicas de laboratório, porém, mesmo conhecendo o efeito de uma substância tóxica sobre as diferentes espécies que compõem um ecossistema, continua sendo difícil prever o efeito sobre todo o ecossistema (Jochman et al., 2011), pois as mudanças diretas, bem como indiretas no ecossistema não são facilmente previsíveis a partir de experimentos de laboratório (Jochmann, e Blanckenhorn, 2016). Conseqüentemente, a comunidade científica está considerando testar o efeito de fármacos veterinários em todo o ecossistema ou comunidade no campo (Jochmann et al., 2011; Adler et al., 2016; Floate et al., 2016), além de verificar a excreção dessas substâncias pelo organismo animal, bem como os seus metabólitos (Zortéa et al., 2017).

2.2.7 CONCLUSÃO

O fármaco comercial fipronil foi o que apresentou maior efeito tóxico entre os organismos, os colêmbolos da espécie *F. candida* foram os mais sensíveis com reduções significativas em doses muito baixas deste fármaco em ambos os solos testados, enquanto as minhocas *E. andrei* e enquitreídeos *E. crypticus* apresentaram sensibilidade apenas nas maiores doses avaliadas no SAT.

Ao contrário do fipronil os compostos a base de nim não apresentaram efeitos de toxicidade para nenhum dos organismos edáficos testados, com exceção dos colêmbolos *F. candida* que apresentaram redução significativa nas doses de 500 e 1.000 mg kg⁻¹ de torta de nim em SAT.

Esses resultados apresentam novas perspectivas sobre a toxicidade de medicamentos veterinários utilizados no controle de parasitas, que são de grande importância uma vez que a

busca por sistemas produtivos que não agridem o meio ambiente, a qual é primordial para a manutenção das atividades agropecuárias e a produção animal sustentável.

2.2.8 REFERÊNCIAS

- Aajoud A, Ravanel P, Tissut M. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. *J. Agric. Food. Chem.* 2003; 51: 1347-1352.
- Adler N, Bachmann J, Blanckenhorn WU, Floate KD, Jensen J, Römbke J. Effects of ivermectin application on the diversity and function of dung and soil fauna: Regulatory and scientific background information. *Environ. Toxicol. Chem.* 2016; 35: 1914 -1923
- Akca I, Tuncer C, Guler A, Saryhan I. Residual toxicity of 8 different insecticides on honey bee (*Apis mellifera* Hymenoptera: Apidae). *J. Anim. Vet. Adv.* 2009; 8: 436 - 440.
- Alves PRL, Cardoso EJBN, Martines AM, Sousa JP, Pasini A. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. *Chemosphere.* 2013; 90: 2674-2682.
- Alves PRL, Cardoso EJBN, Martines AM, Sousa JP, Pasini A. Seed dressing pesticides on springtails in two ecotoxicological laboratory tests. *Ecotox. Environ. Safe.* 2014; 105: 65-71.
- Arnold KE, Boxall AB, Brown AR, Cuthbert RJ, Gaw S, Hutchinson TH, Jobling S, Madden JC, Metcalfe CD, Naidoo V, Shore RF, Smits JE, Taggart MA, Thompson HM. Assessing the exposure risk and impacts of pharmaceuticals in the environment to individuals and ecosystems. *Biol. Lett.* 2013; 9: 1-4.
- Bártíková H, Podlipná R, Skálová L. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere.* 2016; 144: 2290-2301.
- Beynon SA. Potential environmental consequences of administration of anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 2012; 189: 113-124.
- Bobé A, Cooper J-F, Coste CM, Muller M-A. Behavior of fipronil in soil under Sahelian plain field conditions. *Pestic. Sci.* 1998; 52: 275-281.
- Botinelli N, Jouquet P, Capowiez Y, Podwojewski P, Grimaldi M, Peng X. Why is the influence of soil macrofauna on soil structure only considered by soil ecologists? *Soil Till. Res.* 2015; 146: 118-124.

- Broglia-Micheletti SM, Dias NS, Valente ECN, Souza AS, Lopes DOP, Santos JM. Ação de extrato e óleo de nim no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2010; 19: 44-48.
- Brooks BW, Maul J, Belden J, 2007. Emerging contaminants: antibiotics in aquatic and terrestrial ecosystems. In: Jorgensen SE. (Ed.), Encyclopedia of Ecology. Elsevier Press, London, UK.
- Chelinho S, Domene X, Campana P, Natal-Da-Luz T, Scheffczyk A, Römbke J, Andrés P, Sousa JP. Improving Ecological Risk Assessment in the Mediterranean Area: selection of reference soils and evaluating the influence of soil properties on avoidance and reproduction of two Oligochaete species. Environ. Toxicol. Chem. 2011; 30: 1050-1058.
- Cole LM, Nicholso RA, Casida JE. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. Pestic. Biochem. Phys. 1993; 46: 47-54.
- Day KE, Scott IM. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. Aquat Toxicol. 1993; 18: 101-114.
- Di Nica V, Menaballi L, Azimonti G, Finizio A. RANKVET: A new ranking method for comparing and prioritizing the environmental risk of veterinary pharmaceuticals. Ecol. Indic. 2015; 52: 270-276.
- Floate KD, Düring RA, Hanafi J, Jud P, Lahr J, Lumaret J-P, Scheffczyk A, Tixier T, Wohde M, Römbke J, Sautot L, Blanckenhorn WU. Validation of a standard test method in four countries to assess the toxicity of residues in dung of cattle treated with veterinary medical products. Environ. Toxicol. Chem. 2016; 35: 1934-1946
- Förster M, Laabs V, Lamshöft M, Groeneweg J, Zühlke S, Spiteller M, Krauss M, Kaupen-johann M, Amelung W. Sequestration of manure-applied sulfadiazine residues in soils. Environ. Sci. Technol. 2009; 43: 1824-1830.
- Fountain MT, Hopkin SP. *Folsomia candida* (Collembola): A “Standard” Soil Arthropod. Annu. Rev. Entomol. 2005; 5: 20-22.
- Gant DB, Chalmers AE, Wolff MA, Hoffman HB, Bushey D. Fipronil: action at the GABA receptor. Rev. Toxicol. 1998; 2: 147-156.

- Garcia M. Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. 291f. Tese (Doutorado) - Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät, Universidade de Bonn. 2004.
- Greenslade P, Vaughan GT. A comparison of Collembola species for toxicity testing of Australian soils. *Pedobiologia*. 2003; 47: 171-179.
- Grundy DL, Still CC. Inhibition of acetylcholinesterases by pulegone¹, 2-epoxide. *Pestic. Biochem. Phys.* 1985; 23: 383-388.
- Havlicek E. Soil biodiversity and bioindication: From complex thinking to simple acting. *Eur. J. Soil Biol.* 2012; 49: 80-84.
- International Organization for Standardization - ISO 11268-2. Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) - Part 2: Determination of effects on reproduction. Geneva: 1998.
- International Organization for Standardization - ISO 16387. Soil quality - Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) - Determination of Effects on Reproduction and Survival. Geneva: 2004.
- International Organization for Standardization - ISO 11267. Soil Quality. Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. Geneva: 1999.
- Jänsch S, Frampton GF, Römbke J, Van den Brink PJ, Scott-Fordsmand JJ. Effects of pesticides on soil invertebrates in model ecosystem and field studies: a review and comparison with laboratory toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 2016; 25: 2490-2501.
- Jochmann R, Blanckenhorn WU. Non-target effects of ivermectin on trophic groups of the cow dung insect community replicated across an agricultural landscape. *Basic. Appl. Ecol.* 2015; 17: 291-299.
- Jochmann R, Blanckenhorn WU, Bussière LF, Eirkson CE, Jensen J, Kryger U, Lahr J, Lumaret J-P, Römbke J, Wardhaugh KG, Floate KD. How to test nontarget effects of veterinary pharmaceutical residues in livestock dung in the field. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 2011; 7: 287-296.
- Jones OA, Voulvoulis N, Lester JN. Potential impact of pharmaceuticals on environmental health. *Bull. World Health Organ.* 2003; 81: 768-769.

- Keane S, Ryan MF. Purification, characterisation and inhibition of mono-terpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria melonella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1999; 29: 1097-1104.
- Kreutzweiser D, Thompson D, Grimalt S, Chartrand D, Good K, Scarr T. Environmental safety to decomposer invertebrates of azadirachtin (neem) as a systemic insecticide in trees to control emerald ash borer. *Ecotox. Environ. Safe.* 2011; 74: 1734-1741.
- Kumar P, Bhadauria T, Mishra J. Impact of application of insecticide quercetin/azadirachtin and chlorpyrifos on earthworm activities in experimental soils in Uttar Pradesh India. *Sci. Postprint.* 2015; 1: 1-5.
- Kummerer K. Pharmaceuticals in the environment. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 2010; 35: 1-374.
- Kuperman RG, Checkai RT, Garcia MVB, Rombke J, Stephenson GJ, Sousa JP. State of the science and the way forward for the ecotoxicological assessment of contaminated land. *Pesq. Agropec. Bras.* 2009; 44: 811-824.
- Liess M, Beketov M. Traits and stress: keys to identify community effects of low levels of toxicants in test systems. *Ecotoxicology.* 2011; 20: 1328-1340.
- Lumaret JP, Errouissi F, Floate K, Roembke J, Wardhaugh K.. A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in the terrestrial and aquatic environment. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2012; 13: 1004-1060.
- Martins AP. Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrado em dose única a ratos. 2009. 86f. Dissertação (Mestrado Ciências) - Departamento de Patologia Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.
- Mikunthan G, Pratheeban S. Suppressive Effect of Neem Leaves on Barnyard Earthworm, *Eisenia foetida*. a paper presented at a workshop on "Neem Research in Sri Lanka: Current Trends and Future Prospects" on 3 - 4 August, 2006 at National Science Foundation, Sri Lanka, 2006.
- Miller J A, Chamberlain WF. Azadirachtin as a larvicide against the horn fly, stable fly, and house fly (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.* 1989; 82: 1375-1378.
- Miyazawa M, Watanabe H, Kameoka H. Inhibition of acetylcholinesterase activity by mono-terpenoids with a pmenthane skeleton. *J. Agric. Food Chem.* 1997; 45: 677-679.

- Mostert MA, Schoeman AS, Van Der Merwe M. The relative toxicities of insecticides to earthworms of the *Pheretima* group (Oligochaeta). *Pest. Manage. Sci.* 2002; 58: 446-450.
- Muangphra P, Gooneratne R. Toxicity of commercial neem extract to earthworms (*Pheretima peguana*). *Appl. Environ. Soil Sci.* 2011; 2011: 1-8.
- Natal-da-Luz T, Römbke J, Sousa J.P. Avoidance tests in site-specific risk assessment— influence of soil properties on the avoidance response of collembola and earthworms. *Environ Toxicol Chem.* 2008; 27: 1112-1117.
- Nathan SS, Hisham A, Jayakumar G. Larvicidal and growth inhibition of the malaria vector *Anopheles stephensi* by triterpenes from *Dysoxylum malabaricum* and *Dysoxylum Beddomei*. *Fitoterapia.* 2008; 79: 106-111.
- Nunes MET, Espíndola ELG. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectina in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. *Ecotoxicology.* 2012;2: 1063-1071.
- Qin F, Gao Y, Xu P, Guo B, Li J, Wang H. Enantioselective bioaccumulation and toxic effects of fipronil in the earthworm *Eisenia foetida* following soil exposure. *Pest Manag Sci.* 2015; 71: 553-561
- Rattan RS. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Prot.* 2010; 29: 913-920.
- Ribeiro S, Sousa JP, Nogueira AJA. Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 2001; 49: 131-138.
- Ryan MF, Byrne O. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholineesterase. *J. Chem. Ecol.* 1988; 14: 1965-1975.
- Sakuma M. Probit analysis of preference data. *Appl. Entomol. Zool.* 1998; 33: 339-347.
- San Miguel A, Raveton M, Lempérière G, Ravane, P. Phenylpyrazoles impact on *Folsomia candida* (Collembola). *Soil. Biol. Biochem.*, 2008; 40: 2351-2357.
- Santos LH, Araujo AN, Fachini A, Pena A, Delerue- Matos C, Montenegro M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard Mater.* 2010; 175: 45-95.
- Sarawaneeyaruk S, Krajangsang S, Pringsulaka O. The effects of neem extract and azadirachtin on soil microorganisms. *Soil Sci. Plant Nutr.* 2015; 15: 1071-1083.

- Sartor IF, Santarém VA. Agentes empregados ao controle de ectoparasitos, in: Spinola HS, Gornia SL, Bernardi MM. (Ed.) Farmacologia aplicada à medicina veterinária. Guanabara Kooga, Rio de Janeiro, 2006; pp. 567-583.
- Schmutterer H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. . Annu. Rev. Entomol. 1910; 35: 271-297.
- Segat JC, Alves PRL, Baretta D, Cardoso EJBN. Ecotoxicological evaluation of swine manure disposal on tropical soils in Brazil. Ecotox. Environ. Safe. 2015; 122: 91-97.
- Silva FF, Soares MCSC, Alves LC, Lima MM, Silva AV L, Faustino MAG, Silva Junior FF. Avaliação comparativa da eficácia de fitoterápicos e produtos químicos carrapaticidas no controle do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) por meio do biocarrapaticidograma. Med. Vet. 2008; 2: 1-8.
- Stark JD. Comparison of the Impact of a Neem Seed-Kernel Extract Formulation, Margo-san-0 and Chlorpyrifos on Non-Target Invertebrates Inhabiting Turf Grass. Pesti. Sci. 1992; 36: 293-299.
- Statsoft. Sataistica 7.0 (data analysus software system). [s.l.]. 2004. Disponível em:<<http://www.statsoft.com>> Acesso em: 15 mai. 2014.
- Stevens MM, Helliwell S, Warren GN. Fipronil seed treatments for the control of chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in aerially-sown rice crops. Field Crops Res. 1998; 57: 195-207.
- Sturm A, Wogram J, Hansen PD, Liess M. Potential use of cholinesterase in monitoring low levels of organophosphates in small stream: natural variability in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and relation to pollution. Environ Toxicol Chem. 1999; 18: 194-200.
- Tanzubil PB, McCaffery AR. Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the African armyworm, *Spodoptera exempta*. Crop Prot. 1990; 9: 383-386.
- Tingle CC, Rother JA, Dewhurs CF, Lauer S, King WJ. Fipronil: Environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 2003; 176: 1-66.
- Tolls J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. Environ. Sci. Technol. 2001; 35: 3397-3406.

- Torkhani AL, Erzven NK. Does ivermectin attract earthworms? *J. Soils Sedim.* 2011; 11: 124-128.
- United States Department of Agriculture—USDA 2014 Keys to Soil Taxonomy. Natural Resource Conservation Service, Twelfth Ed, 360.
- University of Texas Health Science Center, 2002. ImageTool 3.0. San Antonio.
- Walker P., Stor P.G, Hose GC. Comparative effects of pesticides, fenitrothion and fipronil, applied as ultra-low volume formulations for locust control, on non-target invertebrate assemblages in Mitchell grass plains of south-west Queensland, Australia. *Crop Prot.* 2016; 89: 38-46.
- Wall R, Beynon S. Area-wide impact of macrocyclic lactone parasiticides in cattle dung. *Med. Vet. Entomol.* 2012; 26: 1-8.
- Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, Al-Abed Y, Wang H, Metz C, Miller EJ, Tracy KJ, Ulloa L. Cholinergic agonists inhibit HMGB₁ release and improve survival in experimental sepsis. *Nature Med.* 2004; 10: 1216-1221.
- Zhang H, Zhou Y, Huang Y, Wu L, Liu X, Lou Y. Residues and risks of veterinary antibiotics in protected vegetable soils following application of different manures. *Chemosphere.* 2016; 152: 229-237.
- Zhao, X, Yeh JZ, Salgado VL, Narahashi T. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004; 310: 192-201.

Tabelas

Tabela 2.2. Parâmetros físicos e químicos do Latossolo Vermelho distrófico* (LVd) e do Solo Artificial Tropical (SAT)

	MO ¹ (%)	pH	CTC ²	Argila (%)	P (mg dm ⁻³)	K	Ca	Mg	H+Al	Cu	Zn	Fe	SB ³
							..(cmol _c dm ⁻³)..		(mg dm ⁻³).....			
LVd	3,9	4,3	12,3	55,0	3,5	124,0	3,2	1,0	7,8	1,4	0,8	79,7	36,5
SAT	5,0	5,8	77,0	20,0	28,0	0,07	25,0	9,0	12,0	0,2	6,0	1,9	65,0

*Segundo o Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos (EMBRAPA, 2006)

¹MO - Matéria Orgânica.²CTC - Capacidade de Troca Catiônica em pH 7,0.³SB - Soma de bases.**Tabela 2.3.** Critérios de validação dos testes conduzidos com organismos *E. andrei* segundo normas ISO 11268-2 (1998), para extrato de nim, torta de nim e fipronil em LVd e SAT.

	Mortalidade adultos (%)	Nº juvenis	CV juvenis (%)
Latossolo Vermelho distrófico (LVd)			
Extrato de nim	0	60	20,8
Torta de nim	0	69	17,8
Fipronil	0	129	10,5
Solo Artificial Tropical (SAT)			
Extrato de nim	0	129	9,5
Torta de nim	0	132	9,9
Fipronil	1	112	17,6

Tabela 2.4. Critérios de validação dos testes conduzidos com organismos *E. crypticus* segundo normas ISO 16387 (2004), para extrato de nim, torta de nim e fipronil em LVd e SAT.

	Mortalidade adultos (%)	Nº juvenis	CV juvenis (%)
Latossolo Vermelho distrófico (LVd)			
Extrato de nim	22	889	10,7
Torta de nim	20	581	36,6
Fipronil	15	620	9,3
Solo Artificial Tropical (SAT)			
Extrato de nim	35	491	15,1
Torta de nim	20	500	29,3
Fipronil	19	786	10,5

Tabela 2.5. Critérios de validação dos testes conduzidos com organismos *F. candida* segundo normas ISO 11267 (1999), para extrato de nim, torta de nim e fipronil em LVd e SAT.

	Mortalidade adultos (%)	N° juvenis	CV juvenis (%)
Latossolo Vermelho distrófico (LVd)			
Extrato de nim	14	231	20,0
Torta de nim	12	288	22,3
Fipronil	14	104	14,4
Solo Artificial Tropical (SAT)			
Extrato de nim	12	253	9,5
Torta de nim	18	403	18,6
Fipronil	10	240	22,0

Figuras

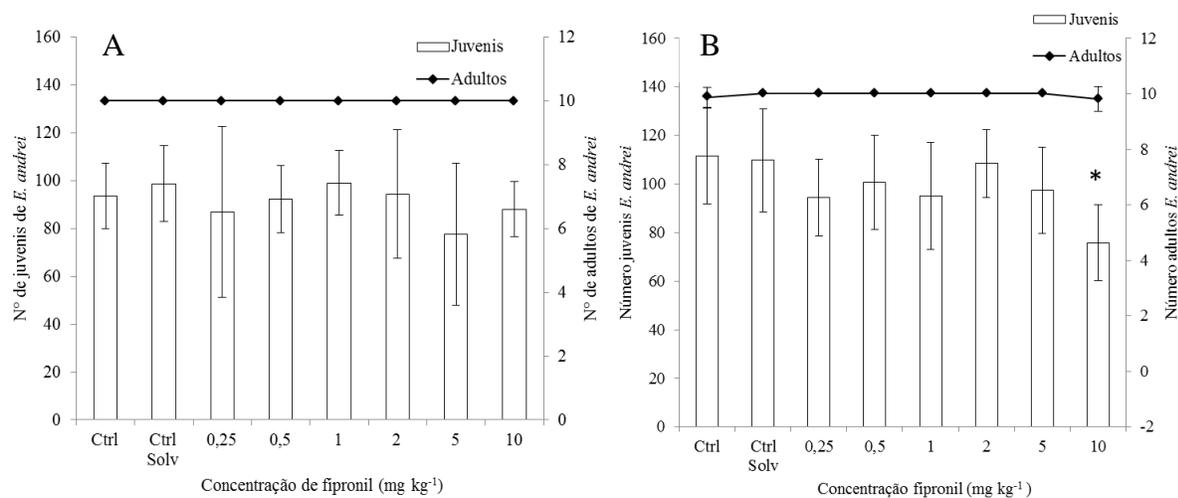


Figura 2.3. Sobrevivência (linhas) e reprodução (barras) de *Eisenia andrei* quando exposta a solo não contaminado e contaminado com fipronil em Latossolo Vermelho distrófico (A) e Solo Artificial Tropical (B). (T) desvio-padrão ($n = 5$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos ($p < 0,05$; one-way ANOVA seguido de teste de Dunnett).

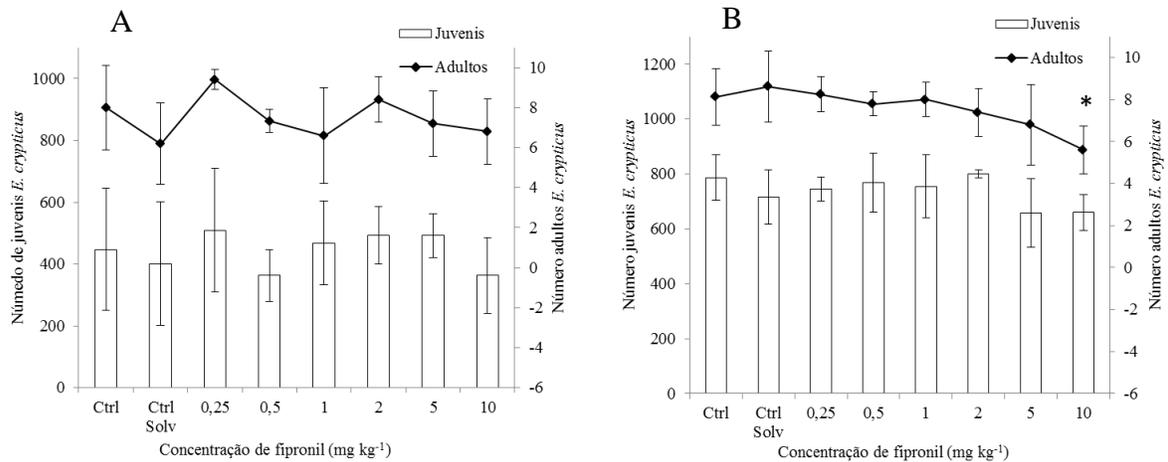


Figura 2.4 - Sobrevivência (linhas) e reprodução (barras) de *Enchytraeus crypticus* quando exposto a solo não contaminado e contaminado com fipronil em Latosolo Vermelho distrófico (A) e Solo Artificial Tropical (B). (⊥) desvio-padrão ($n = 5$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos ($p < 0,05$; *one-way* ANOVA seguido de teste de Dunnett).

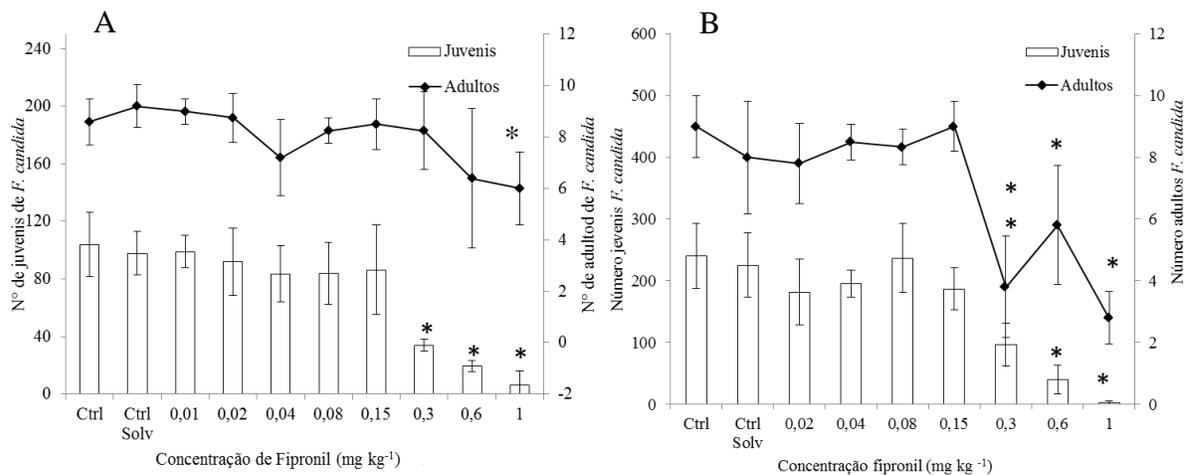


Figura 2.5 - Sobrevivência (linhas) e reprodução (barras) de *Folsomia candida* quando exposta a solo não contaminado e contaminado com fipronil em Latosolo Vermelho distrófico (A) e Solo Artificial Tropical (B). (⊥) desvio-padrão ($n = 5$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos ($p < 0,05$; *one-way* ANOVA seguido de teste de Dunnett).

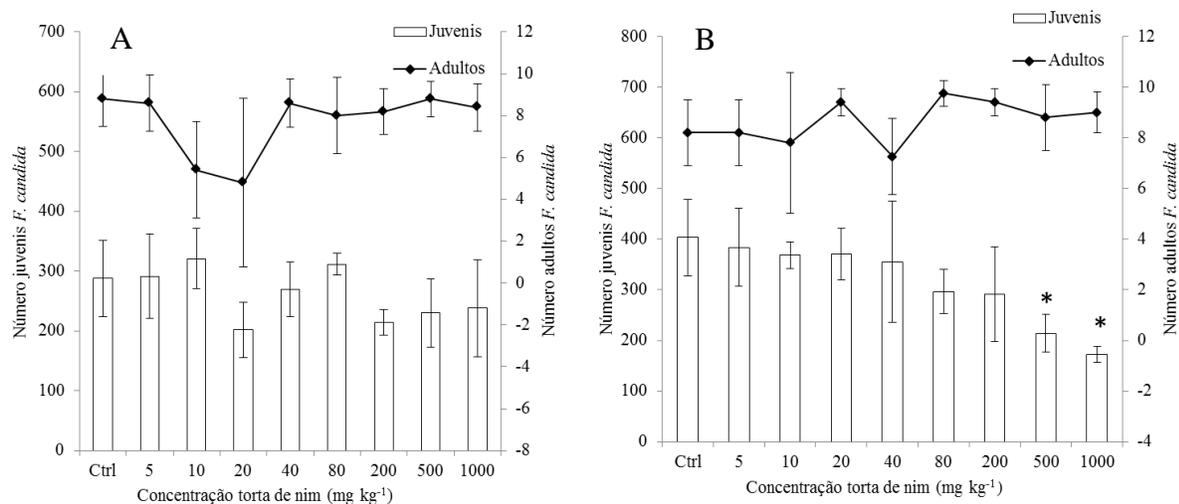
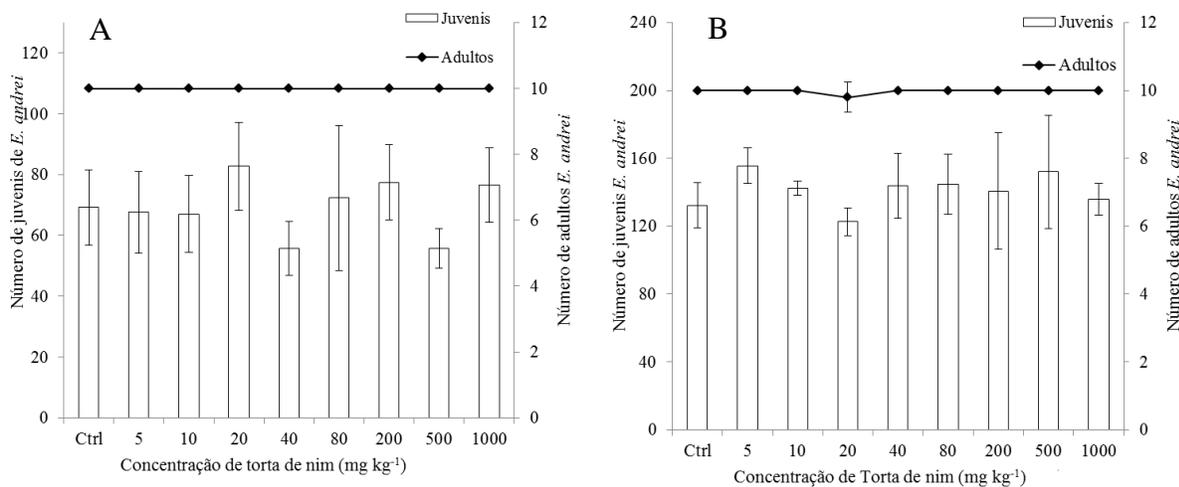
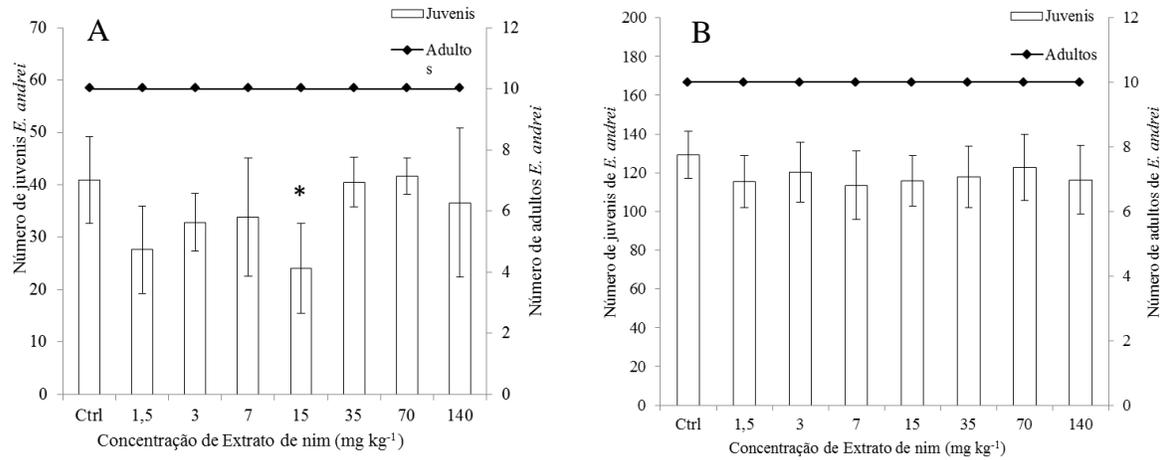


Figura 2.6 - Sobrevivência (linhas) e reprodução (barras) de *Folsomia candida* quando exposta a solo não contaminado e contaminado com torta de nim em Latossolo Vermelho distrófico (A) e Solo Artificial Tropical (B). (⊥) desvio-padrão ($n = 5$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos ($P < 0,05$; *one-way* ANOVA seguido de teste de Dunnett).

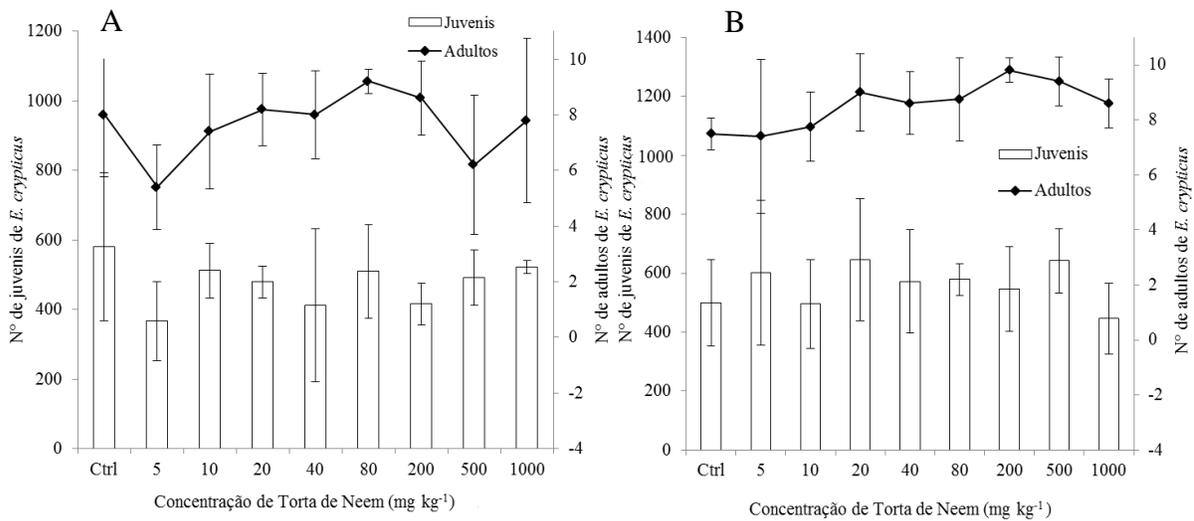
Anexos



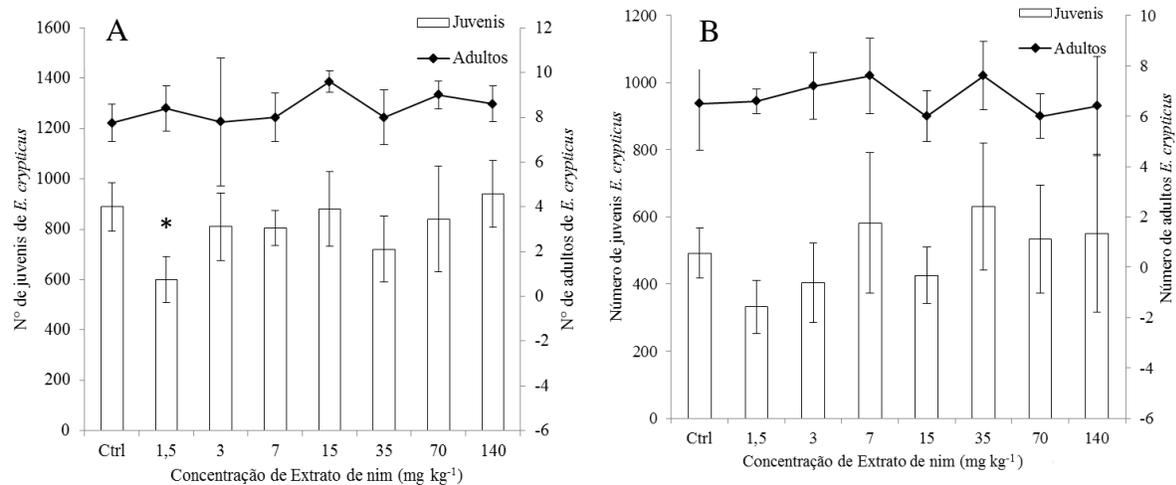
Anexo 2.1 - Sobrevivência (linhas) e reprodução (barras) de *Eisenia andrei* quando exposta a solo não contaminado e contaminado com torta de nim em Latossolo Vermelho distrófico (A) e Solo Artificial Tropical (B). (⊥) desvio-padrão ($n = 5$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos ($p < 0,05$; *one-way* ANOVA seguido de teste de Dunnett).



Anexo 2.2 - Sobrevivência (linhas) e reprodução (barras) de *Eisenia andrei* quando exposta a solo não contaminado e contaminado com extrato de nim em Latosolo Vermelho distrófico (A) e Solo Artificial Tropical (B). (⌈) desvio-padrão ($n = 5$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos ($p < 0,05$; *one-way* ANOVA seguido de teste de Dunnett).



Anexo 2.3 - Sobrevivência (linhas) e reprodução (barras) de *Enchytraeus crypticus* quando exposta a solo não contaminado e contaminado com torta de nim em Latosolo Vermelho distrófico (A) e Solo Artificial Tropical (B). (⌈) desvio-padrão ($n = 5$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos ($p < 0,05$; *one-way* ANOVA seguido de teste de Dunnett).



Anexo 2.4 - Sobrevivência (linhas) e reprodução (barras) de *Enchytraeus crypticus* quando exposta a solo não contaminado e contaminado com extrato de nim em Latossolo Vermelho distrófico (A) e Solo Artificial Tropical (B). (⊥) desvio-padrão ($n = 5$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos ($p < 0,05$; *one-way* ANOVA seguido de teste de Dunnett).

2.3 MANUSCRITO III - Avaliação ecotoxicológica do fipronil e seus metabólitos sobre colêmbolos em solos tropicais

De acordo com normas para publicação em:

Revista Brasileira de Ciência do Solo

2.3.1 RESUMO

Os fármacos veterinários vêm sendo considerados contaminantes emergentes em locais de grande produção pecuária, dentre eles o fipronil é considerado altamente tóxico. Entretanto, ainda são poucas as informações que determinam qual o nível de toxicidade dos metabólitos do fipronil para organismos não-alvo. O objetivo do trabalho é avaliar a toxicidade do fármaco veterinário fipronil e seus metabólitos fipronil sulfona e fipronil desulfinil sobre colêmbolos *Folsomia candida*. Para a realização dos testes ecotoxicológicos foram utilizados três tipos de solos, sendo dois deles solos naturais [Latossolo Vermelho distrófico (LVd) e Neosolo Quartzarênico Órtico típico (Rqo)] e um substrato artificial (Solo Artificial Tropical - SAT). Os tratamentos consistiram em doses crescentes de um medicamento veterinário com ingrediente ativo a base de fipronil e de dois seus principais metabólitos o fipronil sulfona e fipronil desulfinil. As doses aplicadas para fipronil foram 0; 0,02; 0,04; 0,08; 0,15; 0,30; 0,60 e 1 mg kg⁻¹ do ingrediente ativo. Já para os metabólitos fipronil sulfona e fipronil desulfinil as doses testadas foram: 0; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,15; 0,30; 0,60, 1 e 5 mg kg⁻¹ do metabólito. Os efeitos de toxicidade sobre *F. candida* foram avaliados através de testes de sobrevivência e reprodução, baseados nos métodos descritos pela ISO 11267, com delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com seis réplicas para os testes com fipronil e oito para os testes com os metabólitos. Os resultados mostram que o fipronil e seus metabólitos, mesmo em concentrações muito baixas no solo ocasionam toxicidade para colêmbolos *F. candida*, sendo que os efeitos de redução na reprodução podem ser observados

em concentrações a partir de $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$. Houve pouca diferença nos níveis de toxicidade (LC_{50} e EC_{50}) entre o fipronil e seus metabólitos, porém a diferença esteve mais relacionada ao tipo de solo, onde o solo artificial (SAT) apresentou maior sensibilidade em relação aos dois solos naturais (LVd e RQo). Diante destes resultados, é mostrada a importância de se realizar ensaios ecotoxicológicos como solos naturais afim de, garantir um resultado mais real sobre a toxicidade de fármacos veterinários no meio ambiente.

Palavras-chave: contaminação ambiental, fipronil sulfona, fipronil disulfenil, ecotoxicologia terrestre, *Folsomia candida*.

2.3.2 ABSTRACT

Veterinary drugs have been considered to be emerging contaminants in large livestock production sites, among which fipronil is considered highly toxic. However, there is still little information that determines the level of toxicity of fipronil to non-target organisms. The objective of this work is to evaluate the toxicity of the veterinary drug fipronil and its metabolites fipronil sulfone and fipronil desulfinil on *Folsomia candida*. Three types of soils were used to perform ecotoxicological tests, two of them natural soils (Oxisoil (LVd) and Entisoiil (Rqo)) and an artificial substrate (Tropical Artificial Soil - TAS). Treatments consisted of increasing doses of fipronil-based active ingredient (TopLine RED®) and two of its major metabolites were fipronil sulfone and fipronil desulfinyl. The doses applied to fipronil were 0; 0.02; 0.04; 0.08, 0.15; 0.30; 0.60 and 1 mg kg^{-1} of the active ingredient. For the metabolites fipronil sulfone and fipronil desulfinil, the doses tested were: 0; 0.01; 0.02; 0.04; 0.06; 0.08; 0.15; 0.30; 0.60, 1 and 5 mg kg^{-1} of the metabolite. The effects of toxicity on *F. candida* were evaluated by means of survival and reproduction tests, based on the methods described by ISO 11267, with a completely randomized experimental design (DIC) with six replicates for fipronil tests and eight for tests with metabolites. The results show that fipronil and its metabolites, even at very low concentrations in the soil cause toxicity to *F. candida*, and the effects of reduction can be observed in concentrations from 0.15 mg kg^{-1} . There was little difference in the toxicity levels (LC_{50} and EC_{50}) between fipronil and its metabolites, but the difference was more related to the type of soil, where the artificial soil (TAS) pre-

sented greater sensitivity in relation to the two natural soils (LVd and RQo). This implies the importance of performing ecotoxicological tests as natural soils in order to guarantee a more realistic result on veterinary drug toxicity in the environment.

Key words: environmental contamination, Fipronil sulfone, fipronil disulfenil, terrestrial ecotoxicology, *Folsomia candida*.

2.3.3 INTRODUÇÃO

Os fármacos veterinários representam um meio importante de tratamento e prevenção de diversas doenças nos animais de produção. Ainda que os benefícios para a saúde das espécies alvos sejam particularmente importantes, os produtos farmacêuticos quando entram no meio ambiente podem atuar negativamente sobre espécies não alvo (Bártíková et al., 2016). A aplicação de fármacos na pecuária intensiva é a principal forma de entrada no ambiente terrestre através dos dejetos (Manzetti e Ghisi, 2014; Vassilis et al., 2016), sendo que, grande parte destes podem ser excretados como composto original ou parcialmente metabolizados (Tolls, 2001; Cooper et al., 2014) e as formas de excreção incluem o composto ativo e também metabólitos e produtos de transformação (Daughton, 2007).

O fipronil é um fenilpirazol de amplo espectro recomendado para uso agrícola e uso veterinário (Tingle et al., 2003; Faouder et al., 2007), sendo eficaz principalmente no controle de carrapatos (Cid et al., 2016). No entanto, fipronil é altamente tóxico, e poucas são as informações que determinam qual o nível de toxicidade para organismos não-alvo do solo (Alves et al., 2014). Além do produto original o fipronil pode sofrer transformações metabólicas e degradações abióticas em vários produtos (San Miguel et al., 2008). O principal metabólito do fipronil (Figura 2.7) formados em vertebrados e invertebrados parece ser o fipronil sulfona que ocorre por oxidação (Hainzl e Casida, 1996). Além deste, o fipronil sofre uma reação de fotólise, produzindo o fipronil desulfenil (Hainzl e Casida, 1996) e ainda são produzidos o fipronil amida por hidrólise e o fipronil sulfeto por redução (Pei et al., 2004).

Collembola é uma das ordens mais abundantes no ecossistema terrestre e seus indivíduos são usados para avaliar a qualidade de solos contaminados (Sandifer e Hopkin, 1997; An et al., 2013, Wink et al., 2017). Tais organismos desempenham papel fundamental e são responsáveis pela decomposição de matéria orgânica junto com muitos outros grupos (Eise-

nhauer et al., 2009). A espécie *Folsomia candida* é recomendada para ensaios em protocolos da ISO (1999), sendo a mais representativa para avaliar a qualidade do solo (Smit e Van Gestel, 1996; Fountain e Hopkin, 2005; An et al., 2013; Buch et al., 2016). Portanto, o estudo da resposta de colêmbolos em solos contaminados é de grande interesse (Sousa et al., 2006; Salmon et al., 2014), principalmente em relação aos fármacos veterinários, os quais são considerados contaminantes emergentes em locais de grande produção pecuária (Brooks et al., 2008; Di Nica et al., 2015).

A hipótese de nosso trabalho é que os metabólitos fipronil sulfona e fipronil disulfenil irão apresentar toxicidade superior de que a molécula de fipronil. O presente estudo tem como objetivo avaliar a toxicidade do fármaco veterinário fipronil e seus metabólitos fipronil sulfona e fipronil desulfenil sobre parâmetros de sobrevivência e reprodução de colêmbolos da espécie *Folsomia candida* por meio de ensaios ecotoxicológicos determinados pelas diretrizes da ISO.

2.3.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.4.1 Solo teste

Para a realização dos testes ecotoxicológicos foram utilizados três tipos de solos, sendo dois deles solos naturais com alta predominância no território brasileiro e um substrato artificial amplamente utilizado em ensaios ecotoxicológico. O solos naturais foram o Latossolo Vermelho distrófico (LVd) com textura argilosa, de acordo com USDA (United States Department of Agriculture, 2014), coletado no município de Chapecó - SC nas dependências da Empresa Agropecuária de Pesquisa e Extensão Rural de Santa Catarina - EPAGRI [27°05'274''S e 052°38'085'' W] e o Neossolo Quartzarênico Órtico típico (Rqo) com textura arenosa, de acordo com USDA (2014), coletado no município de Araranguá - SC [29°00'19.98'' S e 49°31'02.84'' W]. Ambos os solos foram coletados na camada superficial de 0-20 cm em uma área de floresta sem histórico de aplicação de pesticidas ou atividade pecuária. Após a coleta o solo foi seco em estufa de circulação forçada a uma temperatura de 65 °C e tamisado em peneira de 2 mm para a separação de fragmentos grosseiros (pedras, raízes, restos vegetais).

O substrato artificial utilizado nos ensaios foi uma adaptação do solo OECD proposto por Garcia (2004), o Solo Artificial Tropical (SAT), consiste em uma mistura de 75% de areia fina, 20% de caulim e 5% de fibra de cocô. Todos os componentes foram misturados de forma homogênea e em seguida o pH foi corrigido com CaCO_3 para que o valor se mantivesse entre 5,5 e 6,5. Foi realizada a mensuração da capacidade máxima de retenção de água (CRA) e a correção da umidade para 65% da CRA máxima. Os parâmetros físicos e químicos dos solos utilizados nos ensaios estão apresentados na Tabela 2.6.

2.3.4.2 Substância teste e doses utilizadas

Os tratamentos consistiam em doses crescentes de um medicamento veterinário com ingrediente ativo a base de fipronil (TopLine RED® 1%) e dois de seus principais metabólitos o fipronil sulfona e fipronil desulfinil, os padrões analíticos dos metabólitos foram adquiridos na empresa Sigma Aldrich®. Como não há na literatura estudos que apresentem a taxa de excreção deste medicamento pelos animais, as doses foram definidas com base em estudos prévios e dados da literatura em que esse ingrediente ativo é usado com outras finalidades (inseticida, tratamento de sementes, etc.) (San Miguel et al., 2008; Alves et al., 2014). As doses testadas para fipronil foram 0; 0,02; 0,04; 0,08, 0,15; 0,30; 0,60 e 1 mg kg^{-1} do ingrediente ativo. Os metabólitos utilizados nos ensaios foram obtidos da empresa Sigma Aldrich®, sendo as doses testadas para fipronil sulfona e fipronil desulfinil: 0; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,15; 0,30; 0,60, 1 e 5 mg kg^{-1} do metabólito. Apenas no substrato artificial (SAT) a dose 0,30 mg kg^{-1} não foi realizada em função de uma perda amostral durante o desenvolvimento dos ensaios.

Como o fipronil e os metabólitos eram insolúveis em água, foi necessário realizar a diluição dos mesmos em acetona antes da contaminação do solo. Para cada concentração foi realizada uma solução solvente preparada de acordo com metodologias previamente descritas por diversos autores (ISO 11267, 1999; Jensen et al., 2003; Bhardwaj et al., 2012; Mandal et al., 2013; Qu et al., 2016). Após a homogeneização cada recipiente com as respectivas doses foram acondicionados em uma câmara de exaustão onde permaneceram por 12 horas, para que houvesse a evaporação total da acetona. Em seguida, a umidade do solo foi corrigida para 65% da capacidade máxima de retenção de campo, e foram adicionados os organis-

mos para início dos testes. Para cada solo foi realizado um tratamento “controle solvente” (solo + acetona), a fim de garantir que não haveriam efeitos do solvente sobre o desempenho reprodutivo dos organismos de teste.

2.3.4.3 Organismo e condições do teste

Os organismos utilizados foram colêmbolos da espécie *Folsomia candida* provenientes de culturas criadas em laboratório segundo normas da ISO 11267 (1999). Os organismos eram criados em potes plásticos contendo uma mistura de gesso e carvão ativado em uma proporção de 11:1, onde eram alimentados semanalmente com fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*) e realizada a correção da umidade. Para a realização dos ensaios ecotoxicológicos os colêmbolos eram sincronizados com idade de 10-12 dias no momento da montagem. As culturas e os ensaios eram mantidos em uma sala climatizada com temperatura de 20 °C (± 1 °C) e fotoperíodo de 12:12 horas luz:escuro.

2.3.4.4 Ensaios ecotoxicológicos

Os efeitos de toxicidade sobre *F. candida* foram avaliados através de testes de sobrevivência e reprodução, baseados nos métodos descritos pela ISO 11267 (ISO, 1999), com seis réplicas para os testes com fipronil e oito para os testes com os metabólitos foram preparadas para cada concentração avaliada. Cada unidade experimental consistia em um pote cilíndrico com 30 g de solo e sua respectiva concentração, onde eram colocados 10 indivíduos sincronizados e cada teste teve duração de 28 dias. No decorrer do período experimental, os potes eram abertos semanalmente para a correção da umidade do solo e aeração, além disso, os organismos foram alimentados no dia 0 e 14 do ensaio, com fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*). Ao final do teste o conteúdo do solo foi despejado em um recipiente maior e adicionado água com algumas gotas de tinta preta e uma leve agitação, o que possibilitou a flutuação dos organismos. As imagens de cada recipiente foram analisadas com ajuda do software Image Tool 3.0 para quantificação dos organismos. Adultos e juvenis (separados por tamanho) foram contados de forma independente.

2.3.4.5 Análise estatística

Os dados de sobrevivência e reprodução dos colêmbolos foram submetidos a análise de variância (ANOVA *One-Way*), seguida pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$) utilizando o software Statistica 7.0. A normalidade e homogeneidade das variáveis foram verificadas através do teste de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Quando as suposições não foram cumpridas os dados eram transformados em logaritmo de X. Os valores de LC₅₀ (concentração letal causando 50% de sobrevivência) foram estimados utilizando o software Pri-Probit® 1.63 (Sakuma, 1998). Os valores de EC₅₀ (concentração efetiva causando 50% dos efeitos sobre a reprodução) foram calculados usando um modelo logístico não linear na análise de regressão por meio do software Statistica 7.0. As concentrações de NOEC (Concentração de efeito não observado) e LOEC (Menor concentração de efeito observado) foram estimadas a partir do Software Statistica 7.0 (Statistica 7.0, 2004).

2.3.5 RESULTADOS

2.3.5.1 Validação dos testes

Todos os testes cumpriram os critérios de validade de acordo com a norma da ISO 11267 (1999). A sobrevivência de adultos para todos os ensaios foi superior a 80% (\geq de 90% para todos os solos). Nos testes de reprodução o número de juvenis nos controles foi acima de 100 indivíduos (média $>$ de 120 indivíduos em todos os solos) com coeficiente de variação inferior a 30%.

2.3.5.2 Ensaio de sobrevivência e reprodução

Tanto o fipronil quanto os metabólitos fipronil sulfona e fipronil desulfenil foram letais aos colêmbolos *F. candida*, mas o nível de toxicidade foi dependente do ingrediente ativo e do tipo de solo avaliado. O fipronil foi avaliado em Neossolo Quartzarênico Órtico típico (RQo) e os valores de NOEC, LOEC, LC₅₀ e EC₅₀ estão apresentados na Tabela 2.7. Nas doses mais elevadas a reprodução foi altamente afetada, sendo quase nula na dose de 1 mg kg⁻¹ de fipronil (Figura 2.8).

Para os metabólitos fipronil sulfona e fipronil desulfinil houve diferença de toxicidade principalmente em relação ao tipo de solo. O SAT e RQo apresentaram valores de LC_{50} inferiores ao estimados para LVd. O mesmo foi observado para os valores estimados de EC_{50} , onde o SAT foi que apresentou menor valor de EC_{50} , sendo de 0,17 (IC: 0,12-0,21) para fipronil desulfinil e 0,17 (IC: 0,12-0,21) para fipronil sulfona. Já o LVd foi que teve maior valor estimado de EC_{50} sendo 0,57 (IC: 0,43-0,71) para fipronil desulfinil e 0,40 (IC: 0,27-0,52) para fipronil sulfona. Já o RQo apresentou valor médio inferior ao LVd, no entanto, os intervalos de confiança se sobrepõe não havendo diferença entre o RQo e LVd. Os valores de NOEC, LOEC, LC_{50} e EC_{50} para fipronil desulfinil e fipronil sulfona estão apresentados na Tabela 2.8.

Os resultados de reprodução com fipronil desulfinil (Figura 2.9) e fipronil sulfona (Figura 2.10), foram muito semelhantes ao próprio fipronil quando comparados com os mesmos solos. Onde nas doses mais baixas não houve redução significativa ($p > 0,05$), enquanto nas maiores doses, principalmente acima de $0,60 \text{ mg kg}^{-1}$ a redução foi superior a 50% na reprodução e na dose de 5 mg kg^{-1} não foi encontrado nenhum indivíduo vivo, para ambos os metabólitos e em todos os solos.

2.3.6 DISCUSSÃO

Os resultados mostram que o fipronil e seus metabólitos, mesmo em concentrações muito baixas no solo ocasionam toxicidade para colêmbolos *F. candida*, sendo que os efeitos de redução podem ser observados em concentrações a partir de $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$ e as diferenças nos níveis de toxicidade estão diretamente relacionadas ao tipo de solo. A mortalidade de adultos e redução da reprodução dos colêmbolos, pode ser atribuída pelo seu mecanismo de ação do fipronil, que causa o bloqueio do neurotransmissor ácido aminobutírico (GABA) (Cole et al., 1993; Tingle et al., 2003; Islam e Lynch, 2012), ocasionando hiperexcitação e morte (Zhao et al., 2004). O GABA desempenha um papel importante na transmissão neural tanto de vertebrados e invertebrados. Contudo, descobriu-se que a seletividade do fipronil em invertebrados não se limita apenas aos receptores de GABA, mas que ele inibe potencialmente os canais de glutamato-cloro (GluCl), que estão presentes em invertebrados, mas não em mamíferos (Ieka et al., 2003; Zhao et al., 2005; Narahashi et al., 2010), sendo muito mais tóxicos para os invertebrados (Hainzl e Casida, 1996; Hovda e Hoser, 2002). Não só o fipro-

nil, mas também os metabólitos sulfeto, sulfona e desufinil também atuam no receptor GABA e são biologicamente ativos (Fenet et al., 2001).

No presente estudo, o fipronil aplicado em RQo apresentou um valor de EC_{50} de 0,14 $mg\ kg^{-1}$ (IC: 0,11-0,16 $mg\ kg^{-1}$), valores inferiores aos encontrados em LVd e SAT de 0,26 $mg\ kg^{-1}$ (0,18-0,35 $mg\ kg^{-1}$) e 0,29 $mg\ kg^{-1}$ (0,22-0,37 $mg\ kg^{-1}$), respectivamente (ver item 2.2.5.4). Outros autores já estudaram os efeitos tóxicos do fipronil em colêmbolos e encontraram o valor de EC_{20} de 0,12 $mg\ kg^{-1}$ em solo artificial (Alves et al., 2013). Resultados semelhantes foram relatados por San Miguel et al. (2008), que encontraram declínios significativos no número de juvenis e valor de EC_{50} em concentrações de fipronil entre 0,33 e 0,50 $mg\ kg^{-1}$ também em solo artificial. Tais estudos foram baseados na utilização do fipronil como inseticida, em ambos os estudos, as concentrações de efeito foram ligeiramente superiores a concentração ambiental predita (PEC) de fipronil no solo (Alves et al., 2013), porém já é o suficiente para causar riscos as comunidades de colêmbolos (Nunes e Espíndola, 2012). Além dos colêmbolos, em estudo desenvolvido por Walker et al. (2016), foi verificado que logo após aplicação de fipronil em uma floresta de eucalipto, houve reduções significativas nas populações de Formicidae, Orthoptera, Coleoptera e Collembola, persistindo por até 79 dias após aplicação.

Os produtos da degradação do fipronil são altamente tóxicos para invertebrados. Contudo, apesar da literatura reportar que os metabólitos sulfona e desulfinil apresentam, respectivamente, afinidades 6 e 15 vezes maiores aos receptores GABA (Hainz et al., 1998; Tavares et al., 2015; Romero et al., 2016). No presente estudo não foi observada grandes diferenças de toxicidade do fipronil em relação os seus metabólitos fipronil sulfona e desulfinil. São poucos os dados diretamente aplicáveis sobre a influência dos produtos de degradação na toxicidade do fipronil aplicado aos organismos não-alvo (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2005). San Miguel et al. (2008) ao avaliarem o efeito tóxico dos metabólitos do fipronil sobre os colêmbolos, verificaram que o fipronil sulfeto foi o metabólito mais tóxico para os colêmbolos após 48 h de contato em solução contaminada com valor de LC_{50} para juvenis de 435 $\mu g\ L^{-1}$ e 758 $\mu g\ L^{-1}$ (correspondente a 0,435 e 0,758 $mg\ kg^{-1}$) para adultos, enquanto para fipronil sulfona os efeitos foram observado apenas após 96 hs de exposição e a LC_{50} foi de 427.23 $\mu g\ L^{-1}$ (0,427 $mg\ kg^{-1}$) em juvenis.

Embora o nosso estudo apresente pouca diferença de toxicidade entre o fipronil e seus metabólitos, houve diferenças acentuadas entre os tipos de solos. O solo artificial (SAT) mostrou-se mais sensível na redução do número de juvenis a contaminação com fipronil e seus metabólitos em relação aos dois solos naturais (LVd e RQo). A toxicidade de compostos químicos está relacionada a fatores, como, a classe textural do solo (teores de argila), conteúdo de matéria orgânica (Filser et al., 2014) e pelo equilíbrio dinâmico entre a fases sólida e líquida do solo nos ambientes terrestres (Smit e Van Gestel, 1998). Todos esses fatores juntos determinam os processo de adsorção dos contaminantes e conseqüentemente os efeitos ecotoxicológicos de forma diferenciada (Domene et al., 2010). Além disso, a força iônica, pH e matéria orgânica também são fatores notáveis que afetam a sorção e, portanto, o destino geral de compostos farmacêuticos no ambiente do solo (Ternes et al., 2007; Chefetz et al., 2008; Yu et al., 2009; Xu et al., 2009).

Segundo Qu et al. (2014), a possível redução da toxicidade em solos naturais pode estar relacionada com o elevado conteúdo de matéria orgânica que possui alta capacidade de adsorção do fipronil, fatores esses atribuídos pela alta capacidade de aderência do fipronil às partículas de argila, além do alto teor de carbono orgânico e baixo pH (Mandal e Singh, 2013). Ravanel et al. (1999) inferiram que ligação de pesticidas lipofílicos, incluindo fipronil, possui difusão lenta dentro e fora da rede de microagregados, típica de Latossolos, onde as partículas orgânicas e minerais estão intimamente associadas, o que indica que os complexos organo-minerais são adsorventes para fipronil e as superfícies minerais contribuíram para a adsorção do fipronil em maior quantidade, pela presença de grandes quantidades de oxi-hidróxidos de ferro (Massuti e Mermut, 2007).

2.3.7 CONCLUSÕES

A presença do fármaco veterinário fipronil e seus metabólitos fipronil sulfona e fipronil desulfonil afetam de forma negativa a sobrevivência e reprodução de colêmbolos *Folsomia candida* nos três solos testados (Latossolo Vermelho distrófico, Neossolo Quartzarênico Órtico típico e Solo Artificial Tropical). Houve pouca diferença nos níveis de toxicidade (LC₅₀ e EC₅₀), entre o fipronil e os metabólitos, porém a diferença esteve mais relacionada entre os tipos de solos. No solo artificial (SAT) houve maior toxicidade em relação aos dois

solos naturais, demonstrando a importância de se realizar ensaios ecotoxicológicos com solos naturais de diferentes características e classes texturais, a fim de garantir um resultado mais real sobre a toxicidade de fármacos veterinários no meio ambiente. Além disso, é necessário desenvolver estudos que determinem a excreção do fármaco fipronil quando aplicado nos animais, uma vez que esse tipo de informação é inexistente e de extrema importância para desenvolvimento de estudos ecotoxicológicos.

2.3.8 REFERÊNCIAS

- Alves PRL, Cardoso EJB, Martines AM, Sousa JP, Pasini A. Seed dressing pesticides on springtails in two ecotoxicological laboratory tests. *Ecotox. Environ. Safe.* 2014; 105: 65-71.
- An YJ, Kim SW, Lee WM. The collembola *Lobelia sokamensis* juvenile as a new soil quality indicator of heavy metal pollution. *Ecol. Indic.* 27; 2013: 56 - 60.
- Bártíková H, Podlipná R, Skálová L. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere.* 144; 2016: 2290-2301.
- Bhardwaj U, Kumar R, Kaur S, Sahoo SK, Mandal K, Battu RS, Singh B. Persistence of fipronil and its risk assessment on cabbage, *Brassica oleracea var. capitata* L. *Ecotox. Environ. Safe.* 79; 2012: 301-308.
- Brooks BW, Maul J, Belden J. Emerging contaminants: antibiotics in aquatic and terrestrial ecosystems. In: Jorgensen SE. (Ed.), *Encyclopedia of Ecology*. Elsevier Press, London, UK, 2008, p.210.
- Buch AC, Niemeyer JC, Correia MEF, Silva-Filho EV. Ecotoxicity of mercury to *Folsomia candida* and *Proisotoma minuta* (Collembola: Isotomidae) in tropical soils: Baseline for ecological risk assessment. *Ecotox. Environ. Safe.* 127; 2016: 22-29.
- Chefetz B, Mualem T, and Ben-Ari J. (2008). Sorption and mobility of pharmaceutical compounds in soil irrigated with reclaimed wastewater. *Chemosphere.* 73; 2008: 1335-43.

- Cid YP, Ferreira TP, Magalhães VS, Correia TR, Scott FB. Injectable fipronil for cattle: Plasma disposition and efficacy against *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.* 220; 2016: 4-8.
- Cole LM, Nicholso RA, Casida JE. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pestic. Biochem. Phys.* 46; 1993: 47-54.
- Cooper KM, McMahon C, Fairweather I, Elliott CT. Potential impacts of climate change on veterinary medicinal residues in livestock produce: An island of Ireland perspective. *Trends Food Sci. Tech.* 44; 2014: 21-35.
- Daughton CG. Pharmaceuticals in the environment: sources and their management. Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle. In: Barcelo D, (Ed.), Petrovic MAB, Wilson & Wilson's D. *Comprehensive Analytical Chemistry Series*, 50. Elsevier Science, 2007, p.564.
- Di Nica V, Menaballi L, Azimonti G, Finizio A. RANKVET: A new ranking method for comparing and prioritizing the environmental risk of veterinary pharmaceuticals. *Ecol. Indic.* 52; 2015: 270-276.
- Domene X, Colón J, Uras MV, Izquierdo R, Àvila A, Alcañiz JM. Role of soil properties in sewage sludge toxicity to soil collembolans. *Soil Biol. Biochem.* 42; 2010: 1982-1990.
- Eisenhauer N, König S, Sabais ACW, Renker C, Buscot F, Scheu S. Impacts of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus intraradices*) on plant performance are not interrelated. *Soil Biol. Biochem.* 41; 2009: 561-567.
- Faouder JL, Bichon E, Brunshwig P, Landelle R, Andre F, Bizec BL. Transfer assessment of fipronil residues from feed to cow milk. *Talanta.* 73; 2007: 710-717.
- Fenet H, Beltran E, Gadji B, Cooper JF, Coste CM. Fate of a phenilpyrazole in vegetation and soil under tropical field conditions. *J. Agric. Food Chem.* 49; 2001: 1293-1297.
- Filser J, Wiegmann S, Schröder B. Collembola in ecotoxicology—Any news or just boring routine? *Appl. Soil Ecol.* 83; 2014: 193-199.
- Fountain MT, Hopkin SP. *Folsomia candida* (Collembola): A “Standard” Soil Arthropod. *Annu. Rev. Entomol.* 5; 2005: 20-22.

- Garcia M. Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. [tese]. Bonn: Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät, Universidade de Bonn; 2004.
- Hainzl D, Casida JE. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93; 12764-12767: 1996.
- Hainzl D, Cole LM, Casida JE. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. Chem. Res. Toxicol. 11; 1998: 1529-1535.
- Hovda LR, Hooser SB. Toxicology of newer pesticides for use in dogs and cats. Vet. Clin. N. Am-Small. 32; 2002: 455-467.
- Ikeda T, Zhao X, Kono Y, Yeh JZ, Narahashi T. Fipronil modulation of glutamate-induced chloride currents in cockroach thoracic ganglion neurons. Neurotoxicology. 2003; 24: 807-815.
- Islam R, Lynch JW. Mechanism of action of the insecticides, lindane and fipronil, on glycine receptor chloride channels Br. J. Pharmacol. 165; 2012: 2707-2720
- ISO 11267, 1999. Soil Quality - Inhibition of Reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by Soil Pollutants. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Jensen J, Krogh PH, Sverdrup LE. 2003. Effects of the antibacterial agent tiamulin, olaquinox and metronidazole and the anthelmintic ivermectin on the soil invertebrate species *Folsomia fimetaria* (Collembola) and *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae). Chemosphere 50; 2003: 437-443.
- Mandal K, Singh B. Persistence of fipronil and its metabolites in sandy loam and clay loam soils under laboratory conditions. Chemosphere. 91; 2013: 1596-1603.
- Manzetti S, Ghisi R. The environmental release and fate of antibiotics. Mar. Pollut. Bull. 79; 2014: 7-15.
- Masutti CSM, Mermut AR. 2007. Sorption of fipronil and its sulfide derivative by soils and goethite. Geoderma. 140; 2007: 1-7.

- Narahashi T, Zhao X, Ikeda T, Nagata K, Yeh JZ. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Human Exp. Toxicol.* 2007; 26: 361-366.
- Nunes MET, Espíndola ELG. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. *Ecotoxicology.* 21; 2012: 1063-1071.
- Pei Z, Yitong L, Baofeng L, Gan JJ. Dynamics of fipronil residue in vegetable-field ecosystem. *Chemosphere.* 57; 2004: 1691-1969.
- Qu H, Ma R-x, Liu D-h, Jing X, Wang F, Zhou Z-q, Wang P. The toxicity, bioaccumulation, elimination, conversion of the enantiomers of fipronil in *Anodonta woodiana*. *J. Hazard. Mater.* 312; 2016: 169-174.
- Qu H, Wang P, Ma R, Qiu X, Xu P, Zhou Z, Liu D. Enantioselective toxicity, bioaccumulation and degradation of the chiral insecticide fipronil in earthworms (*Eisenia fetida*). *Sci. Total Environ.* 485-486; 2014: 415-420.
- Ravanel P, Liégeois MH, Chevallier D, Tissut M. Soil thin-layer chromatography and pesticide mobility through soil microstructures. New technical approach. *J. Chromatogr. A* 864; 1999: 145-154.
- Romero A, Ramos E, Ares I, Castellano V, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Anadón A, Martínez M. A. Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-SY5Y cells: Protection by antioxidants. *Toxicol. Lett.* 252; 2016: 42-49.
- Sakuma M. Probit analysis of preference data. *Appl. Entomol. Zool.* 33; 1998: 339-347.
- Salmon S, Ponge JF, Gachet S, Deharveng L, Lefebvre N, Delabrosse F. Linking species, traits and habitat characteristics of Collembola at European scale. *Soil Biol. Biochem.* 75; 2014: 73-85.
- San Miguel A, Raveton M, Lempérière G, Ravanel P. Phenylpyrazoles impact on *Folsomia candida* (Collembola). *Soil. Biol. Biochem.* 40; 2008: 2351-2357.
- Sandifer RD, Hopkin SP. Effects of temperature on the relative toxicities of Cd, Cu, Pb, and Zn to *Folsomia candida* (Collembola). *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 37; 1997: 125-130.
- Smit CE, van Gestel CAM. Comparison of the toxicity of zinc for the springtail *Folsomia candida* in artificially contaminated and polluted field soils. *Appl. Soil. Ecol.* 3; 1996: 127-136.

- Smit CE, Van Gestel CAM. Effects of soil type, prepercolation, and ageing on bioaccumulation and toxicity of zinc for the springtail *Folsomia candida*. *Environ. Toxicol. Chem.* 17; 1998: 1132-1141.
- Sousa JP, Bolger T, da Gama MM, Lukkari T, Ponge J-F, Simón C, Traser G, Vanbergen AJ, Brennan A, Dubs F, Ivitis E, Keating A, Stofer S, Watt AD. Changes in Collembola richness and diversity along a gradient of land-use intensity: a pan European study. *Pedobiologia.* 50; 2006: 147-156.
- Statsoft. *Statistica 7.0* (data analysis software system). [s.l.]. 2004. Disponível em: <<http://www.statsoft.com>> Acesso em: 15 mai. 2014.
- Tavares MA, Palma IDF, Medeiros HCD, Guelfi M, Santana AT, Mingatto FE. Comparative effects of fipronil and its metabolites sulfone and desulfinyl on the isolated rat liver mitochondria. *Environ. Toxicol. Phar.* 40; 2015: 206-214.
- Ternes TA, Bonerz M, Herrmann N, Teiser B, Andersen HR. Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: An option to remove pharmaceuticals and musk fragrances, *Chemosphere.* 66; 2007: 894-904.
- Tingle CCD, Rother JA, Dewhurst CF, Lauer S, King WJ. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 176; 2003: 1-66.
- Tolls J. Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 35; 2001: 3397-3406.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE—USDA, 2014. Keys to Soil Taxonomy. Natural Resource Conservation Service, Twelfth Ed., p.36.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Ecological Risk Assessment for Fipronil Use to Control Cabbage Maggot in Turnip and Rutabaga. Add assessment of potential for effects to listed fishes, p.51.
- Vassilis LD, George BC, Charalampos PG, Athina PV, Xanthippos KN. Mobility of pharmaceutical compounds in the terrestrial environment: Adsorption kinetics of the macrocyclic lactone eprinomectin in soils. *Chemosphere.* 144; 2016: 1201-1206.
- Walker P W, Story PG, Hose GC. Comparative effects of pesticides, fenitrothion and fipronil, applied as ultra-low volume formulations for locust control, on non-target invertebrate assemblages in Mitchell grass plains of south-west Queensland, Australia. *Crop Prot.* 89; 2016: 38-46.

- Winck BR, Sá ELS, Rigotti VM, Chauvat M. Relationship between land-use types and functional diversity of epigeic Collembola in Southern Brazil. *Appl. Soil Ecol.* 109; 2017: 49-59.
- Xu J, Wu L, Chang AC. Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils, *Chemosphere.* 77; 2009: 1299-1305.
- Yu L, Fink G, Wintgens T, Melin T, Ternes T. Sorption behavior of potential organic wastewater indicators with soils. *Water Res.* 43; 2009: 951-60.
- Zhao X, Yeh JZ, Salgado VL, Narahashi T. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310; 2004: 192-201.
- Zhao X, Yeh JZ, Salgado VL, Narahashi T. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310; 2004: 192-201.

Tabelas

Tabela 2.6. Parâmetros físicos e químicos do Latossolo Vermelho distrófico* (LVd), do Solo Artificial Tropical (SAT) e Neossolo Quartzarênico Órtico típico (RQo).

	MO ¹ (%)	pH	CTC ²	Argila (%)	P (mg dm ⁻³)	K (mg dm ⁻³)	Ca ...(cmol _c dm ⁻³)...	Mg ...(cmol _c dm ⁻³)...	H+Al ...(mg dm ⁻³)...	Cu ...(mg dm ⁻³)...	Zn ...(mg dm ⁻³)...	Fe ...(mg dm ⁻³)...
LVd	3,9	4,3	12,3	55,0	3,5	124,0	3,2	1,0	7,8	1,4	0,8	79,7
SAT	5,0	5,8	77,0	20,0	28,0	0,07	25,0	9,0	12,0	0,2	6,0	1,9
RQo	0,9	4,1	4,9	4,0	6,7	34,0	2,0	0,8	2,0	1,5	1,0	72,5

*Segundo o Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos (EMBRAPA, 2006)

¹MO - Matéria Orgânica.²CTC - Capacidade de Troca Catiônica em pH 7,0.**Tabela 2.7 -** Parâmetros ecotoxicológicos (NOEC, LOEC, LC₅₀ e EC₅₀) calculado com base em teste de sobrevivência (sobrev) e reprodução (reprod) de colêmbolos *Folsomia candida*, expostos ao Neossolo Quartzarênico Órtico típico (RQo) contaminado com um fármaco veterinário a base de fipronil (valores em mg kg⁻¹ solo seco).

Teste	Parâmetro	RQo contaminado com fipronil
Agudo	NOEC _{sobrev}	0,3
	LOEC _{sobrev}	0,6
	LC ₅₀	0,29*
Crônico	NOEC _{reprod}	0,08
	LOEC _{reprod}	0,15
	EC ₅₀	0,14 (IC: 0,11-0,16)

* O valor de LC₅₀ deve ser interpretado cuidadosamente, uma vez que, não foi possível estabelecer limites de confiança.

Tabela 2.8- Parâmetros ecotoxicológicos (NOEC, LOEC, LC₅₀ e EC₅₀) calculado com base em teste de sobrevivência (sobrev) e reprodução (reprod) de colêmbolos *Folsomia candida*, expostos ao Latossolo Vermelho distrófico (LVd), Solo Artificial Tropical (SAT) e Neossolo Quartzarênico Órtico típico (RQo) contaminado com o metabólito fipronil desulfínil e fipronil sulfona (valores em mg kg⁻¹ solo seco).

Teste	Parâmetro	Diferentes solos contaminados com fipronil desulfínil (mg kg ⁻¹)		
		LVd	SAT	RQo
Agudo	NOEC _{sobrev}	0,6	0,6	0,6
	LOEC _{sobrev}	1	1	1
	LC ₅₀	0,89*	0,33*	0,78*
Crônico	NOEC _{reprod}	0,6	0,08	0,15
	LOEC _{reprod}	1	0,15	0,3
	EC ₅₀	0,57 (IC: 0,43-0,71)	0,17 (IC: 0,12-0,21)	0,34 (IC: 0,22-0,47)
Teste	Parâmetro	Diferentes solos contaminados com fipronil sulfona (mg kg ⁻¹)		
		LVd	SAT	RQo
Agudo	NOEC _{sobrev}	0,6	0,3	0,3
	LOEC _{sobrev}	1	0,6	0,6
	LC ₅₀	1,02*	0,37*	0,50*
Crônico	NOEC _{reprod}	0,15	0,08	0,08
	LOEC _{reprod}	0,3	0,15	0,15
	EC ₅₀	0,40 (IC: 0,27-0,52)	0,17 (IC: 0,14-0,21)	0,32 (IC: 0,24-0,40)

* O valor de LC₅₀ deve ser interpretado cuidadosamente, uma vez que, não foi possível estabelecer limites de confiança.

Figuras

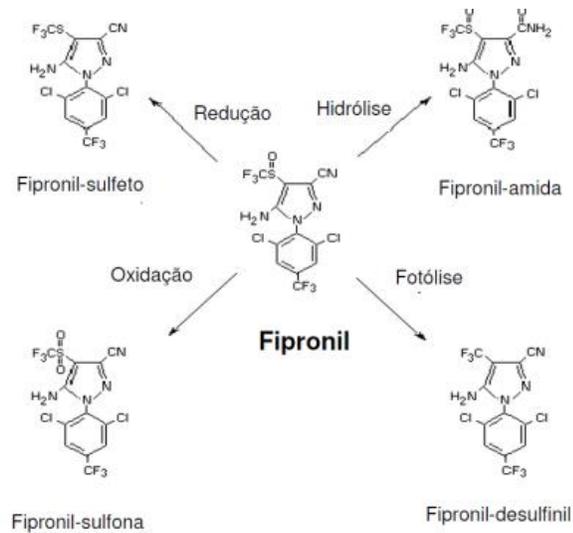


Figura 2.7 - Metabólitos relevantes ou produtos de degradação do fipronil (Adaptado de Pei et al., 2004).

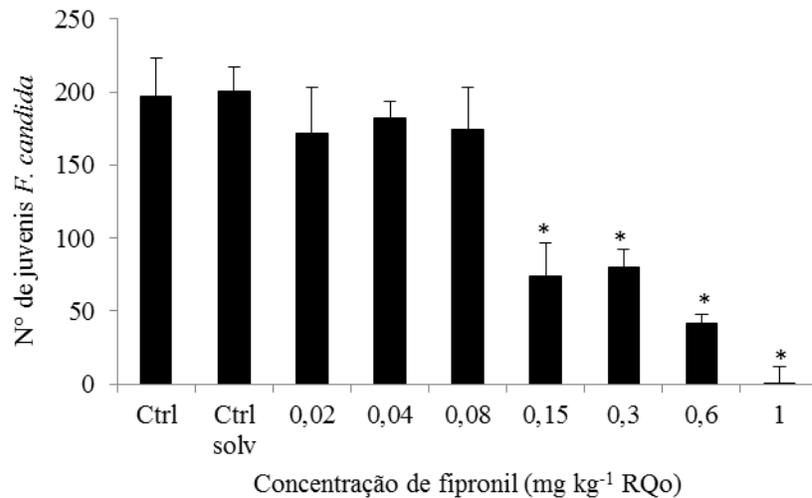


Figura 2.8 - Número médio de juvenis de *Folsomia candida* quando expostos a solo não contaminado e contaminado com o medicamento veterinário com ingrediente ativo fipronil em Neossolo Quartzarênico Órtico típico. (τ) desvio-padrão ($n = 6$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos ($p < 0,05$; *one-way ANOVA* seguido de teste de Dunnett).

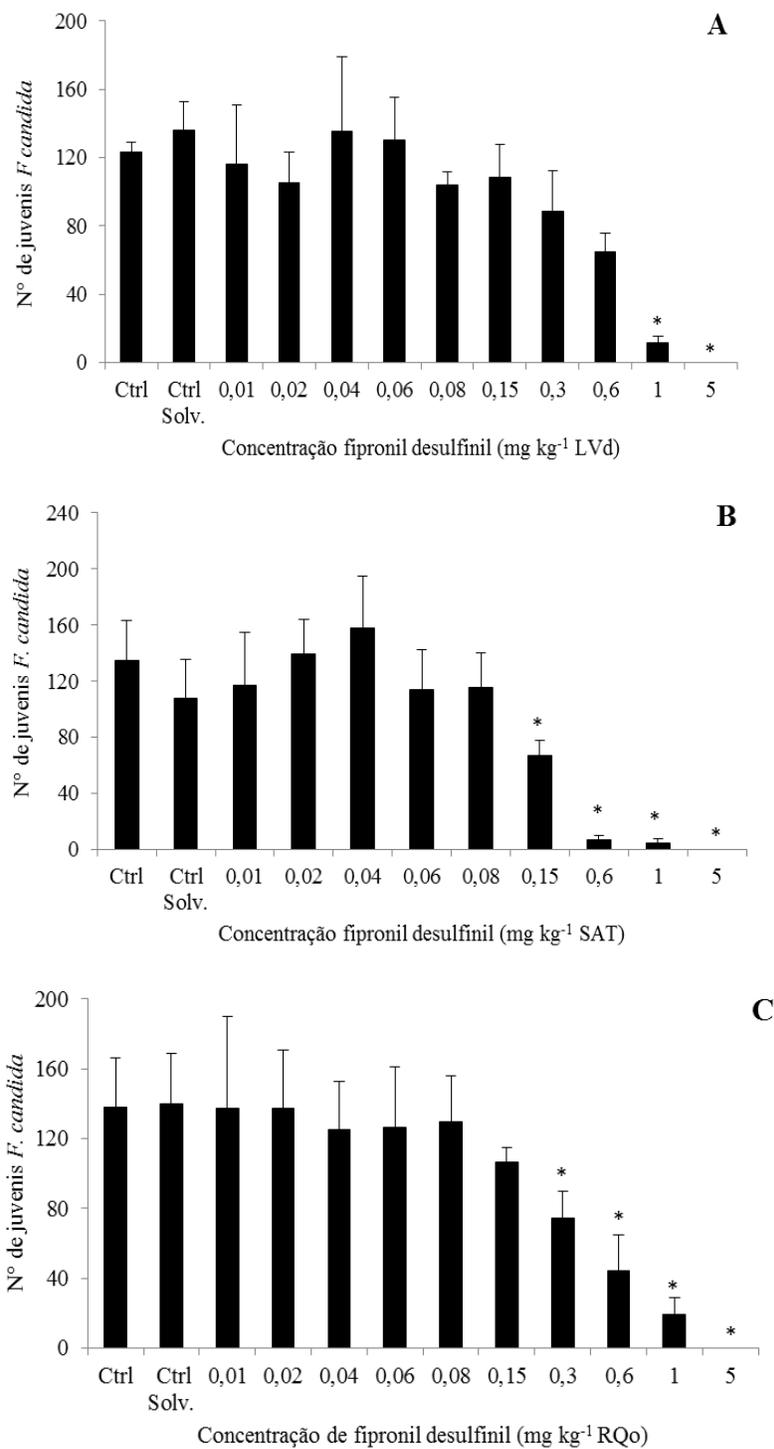


Figura 2.9 - Número médio de juvenis de *Folsomia candida* quando expostos a solo não contaminado e contaminado com o metabólito fipronil desulfenil (A) Latossolo Vermelho distrófico (LVd), (B) Solo Artificial Tropical (SAT) e (C) Neossolo Quartzarênico Órtico típico (RQo). (┐) desvio-padrão ($n = 8$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos ($p < 0,05$; one-way ANOVA seguido de teste de Dunnett).

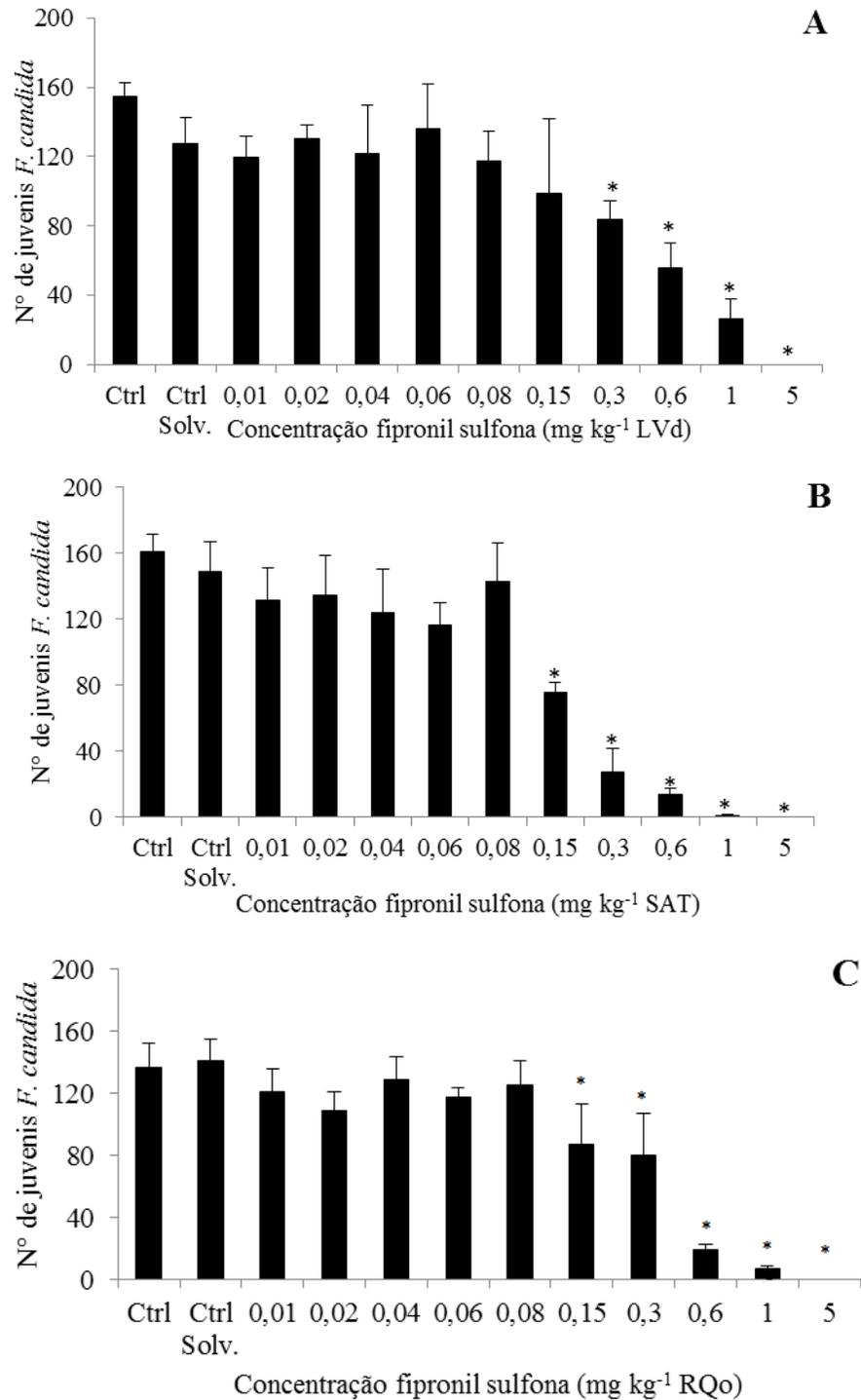


Figura 2.10 - Número médio de juvenis de *Folsomia candida* quando expostos a solo não contaminado e contaminado com o metabólito fipronil sulfona (A) Latossolo Vermelho distrófico (LVd), (B) Solo Artificial Tropical (SAT) e (C) Neossolo Quartzarênico Órtico típico (RQo). (T) desvio-padrão ($n = 8$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos ($p < 0,05$; *one-way* ANOVA seguido de teste de Dunnett).

2.4 MANUSCRITO IV - EFEITOS DE RESÍDUOS DE FÁRMACOS VETERINÁRIOS NAS FEZES DE BOVINOS SOBRE ORGANISMOS NÃO-ALVO.

De acordo com normas para publicação em:

Revista Brasileira de Ciência do Solo

2.4.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a toxicidade das fezes de animais tratados com fipronil e torta de nim sobre a reprodução de colêmbolos *Folsomia candida* em diferentes tempos após o início do fornecimento dos fármacos. O estudo foi dividido em duas etapas. Na etapa 1, animais foram tratados com o fármaco fipronil e torta de nim e um dos grupos foi mantido como controle. Foram realizadas quatro coletas de fezes em diferentes tempos. A etapa 2 foi realizada para verificar a reprodução com *Folsomia candida*. No dia 0 não houveram diferenças no número de juvenis entre as fezes do animal controle e as fezes dos animais tratados com fipronil e nim. As fezes coletadas nos dias 5 e 15 dos animais medicados apresentaram significativa redução da reprodução dos colêmbolos em comparação aos dejetos do animal controle. Como conclusão prévia pode-se observar que tanto as fezes dos animais tratados com fipronil e nim reduziram significativamente a reprodução dos colêmbolos.

2.4.2 ABSTRACT

The objective was to verify the toxicity of dung the animals treated with fipronil and neem cake on reproduction of *Folsomia candida* at different times of collect after the start of drug delivery. The study was divided into two stages. In stage 1, animals were treated with fipronil drug, neem cake and one of the groups was maintained as control. Four feces collections at different times were realized. In stage 2 was realized reproduction test with *Folsomia candida*. At day 0, as expected there were no differences between number juvenile with control animal feces and the feces of treated animals with fipronil and neem. The feces collected on days 5 and 15 of the medicated animals showed a significant reduction of the reproduction of the springtails in comparison the control animals. As a preliminary conclusion it can be observed the feces of the animals treated with fipronil and neem significantly reduced a reproduction of the springtails.

2.4.3 INTRODUÇÃO

Na atividade pecuária o gado é tratado regularmente com uma grande variedade de produtos veterinários e muitas vezes os resíduos desses medicamentos vão para o ambiente através das excretas, de tal forma que são considerados uma classe de poluentes que perturbam o meio ambiente (Jochmann e Blanckenhorn, 2016). Os fatores que influenciam a rota de excreção, a persistência do composto original e seus metabólitos no ambiente, bem como o potencial de resíduos fecais para afetar organismos não-alvo, estão relacionados com a quantidade de ingrediente ativo, formulação, taxa de dosagem, juntamente com o tempo e a frequência de aplicação (Halley et al., 1993; Floate 2005). No esterco, estes resíduos podem causar uma gama de efeitos letais e sub letais, cuja magnitude varia com o composto utilizado, modo de administração, concentração e as espécies de organismos em questão (Wall e Beynon, 2012).

A presença de medicamentos veterinários no solo é capaz de afetar comunidades ecológicas diretamente associadas com o sistema agrícola, principalmente os organismos que tem um ciclo de vida no esterco (Floate et al., 2005; Lumaret et al., 2012; Adler et al., 2016). Porém são observados reflexos também em outras classes de organismos que tem papel importante na manutenção dos sistemas (Zortéa et al., 2017). Membros de qualquer comunidade ecológica estão ligados em redes complexas de concorrência e predação frequentemente formando cadeias tróficas (Pimm 1982) e, normalmente, algumas espécies são mais afetadas por um determinado fármaco que outras (Puniamoorthy et al., 2014).

Nos últimos anos, os estudos sobre os efeitos tóxicos dos medicamentos veterinários vêm aumentando (Floate et al., 2016; Lumaret et al., 2012 e Adler et al., 2016). Sabe-se que alguns medicamentos como piretróides e avermectinas nos animais possuem um pico de excreção que ocorre geralmente na primeira semana após a administração do fármaco (Virilvet et al., 2006; Römbke et al., 2010), além disso, a magnitude da excreção pode estar ligada com a forma de aplicação, injetável, *pour on*, aspersão, sendo que a substância pode ser excretada em uma concentração alta por vários meses (Herd et al., 1996). Porém as informações sobre medicamentos com ingrediente ativo fipronil são escassas, uma vez que apenas no Brasil ele é utilizado na forma de fármaco veterinário (Junquera, 2016). Em função disto, estudos com essa classe de medicamento são de grande importância. Uma alternativa para reduzir o uso de moléculas sintéticas no controle de parasitas são os medicamentos fitoterápicos

compostos por óleos e extratos essenciais de plantas (Broglia-Micheletti et al., 2010). A hipótese de nosso trabalho é que as fezes dos animais que recebem nim não irão apresentar toxicidade e as fezes dos animais tratados com fipronil irá causar toxicidade aos colêmbolos.

Para saber os efeitos dos possíveis resíduos do fármaco fipronil em comparação de um composto fitoterápico fornecido aos animais para controle de parasitas, o presente estudo foi realizado com o objetivo de verificar a toxicidade das fezes de animais tratados com fipronil e torta de nim sobre a reprodução de colêmbolos *Folsomia candida* em diferentes tempos após a aplicação e início do fornecimento dos fármacos.

2.4.4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi dividido em duas etapas, a etapa 1 foi de tratamento dos animais e coleta de fezes a campo e a etapa 2 consistiu na realização de ensaios ecotoxicológicos em laboratório. A etapa 1 foi realizada em uma propriedade rural no município de Lajeado Grande, Santa Catarina. Nove bovinos da raça holandesa com idade entre 3-9 meses, foram divididos em grupos compostos de três animais, onde eram mantidos em baias individuais. Os animais recebiam uma dieta concentrada baseada em 71% milho, 25% farelo de soja e 4% sal mineral, duas vezes por dia e, como volumoso, era fornecido feno uma vez ao dia. Um dos grupos foi mantido como controle, ou seja, sem aplicação ou fornecimento de medicamentos, o segundo grupo teve os animais tratados com o fármaco comercial Top Line Red®, com ingrediente ativo fipronil. A dose aplicada foi a recomendada pelo fabricante de 1 mL a cada 10 kg de peso vivo. Já no terceiro grupo os animais receberam diariamente (até o final do experimento) junto com a dieta concentrada 2% de torta de nim (este valor na dieta se obteve pela substituição de 1% do milho e 1% do farelo de soja).

Os animais foram pesados e divididos de forma que os grupos ficassem mais homogêneo possível. Antes da aplicação dos medicamentos foram coletadas amostras de fezes dos animais (dia 0), e posteriormente procedeu-se mais três coletas, aos 5; 15 e 60 dias após o início do experimento, sendo os resultados dos 60 dias não apresentados neste trabalho. As fezes eram coletadas diretamente na ampola retal dos animais, cerca de 6 vezes ao longo do respectivo dia de coleta e armazenadas individualmente por animal. No final do dia era formada uma amostra composta com uma quantidade igual de fezes de cada animal. O material

era devidamente identificado e acondicionado em freezer (- 15 °C) até a realização dos ensaios no laboratório.

Para o estudo foram utilizadas amostras da camada superficial (0-0,20 m de profundidade) de um solo, classificado como o Neossolo Quartzarênico Órtico típico (RQo) com textura arenosa, coletado no município de Araranguá - SC [29°00'19.98" S e 49°31'02.84" W]. O solo coletado foi seco em estufa à temperatura de 55 °C e peneirado (malha 2 mm).

Nesta etapa foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com oito repetições. Os tratamentos consistiam em um Controle (sem aplicação de dejetos no solo), Animal controle (An. Ctrl); Animal Fipronil (An. Fipronil) e Animal Torta de nim (An. T. Nim), sendo a dose de dejetos aplicada de 4 Mg ha⁻¹. Esta quantidade foi determinada conforme recomendações agronômicas para adubação e manutenção para a cultura de *Avena sativa* com base no Manual de Adubação e Calagem para Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CQFSRS/SC, 2016).

O teste com colêmbolos foi conduzido baseado no protocolo ISO 11267 (1999) e cada réplica consistiu de um recipiente plástico preenchido com 30 g de solo com as fezes dos animais tratados com os diferentes medicamentos. Cada pote recebeu 10 colêmbolos juvenis (10-12 dias de idade), sendo que no início do teste e após 14 dias os organismos foram alimentados com fermento biológico e semanalmente os frascos foram abertos para aeração. Após 28 dias do início do teste, o conteúdo do frasco foi esvaziado para outro recipiente, no qual foi adicionada água e algumas gotas de tinta preta, após uma agitação suave os indivíduos adultos que se encontravam na superfície foram contabilizados e o recipiente foi fotografado para posterior contagem dos juvenis com auxílio do software ImageTool 3.0.

O controle foi utilizado para verificar a validação do teste em solo natural, porém os resultados da reprodução em função do tratamento dos animais foram comparados com o animal controle. Os valores foram submetidos à análise de variância (ANOVA *One-Way*) seguidas do teste de Dunnett ($p < 0,05$). A normalidade e homogeneidade dos dados foram verificadas através do teste de Kolmogorov-Smirnov e Levene respectivamente. Quando esses pressupostos não foram cumpridos os dados foram transformados ($\log x$).

2.4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os ensaios foram validados de acordo com as diretrizes da ISO 11267 (1999), sendo a sobrevivência de adultos acima de 80%, o número de juvenis no controle foi de 195, 331 e 282 para os dias 0, 5 e 15, respectivamente. O coeficiente de variação foi de 12, 12 e 29% para os três ensaios. No dia 0, que se caracteriza antes da aplicação do dejetos, como era esperado não houve diferenças ($p > 0,05$) no número de juvenis entre as fezes do animal controle e as fezes dos animais tratados com fipronil e nim (Figura 2.11).

Aos 5 e 15 dias de coleta após a aplicação de fipronil e início do fornecimento de torta de nim, os dejetos dos animais tratados apresentaram significativa redução da reprodução dos colêmbolos em comparação aos dejetos do animal controle ($p < 0,05$) (Figuras 2.12 e 2.13). Os efeitos de redução no número de juvenis tiveram uma tendência semelhante, onde as fezes dos animais tratados com fipronil tiveram 53,42% menos indivíduos e as fezes dos animais tratados com torta de nim apresentaram redução de 89,78% no dia 5. No dia 15 a redução em relação ao controle foi de 74,11% para fezes de Ani. Fipronil e 93,03% para fezes de An. T. Nim.

Os resultados obtidos no presente estudo inferem que a redução na reprodução dos colêmbolos pode ter sido causada pela presença de resíduos dos compostos fipronil e torta de nim nas fezes dos animais, porém tal inferência deve ser analisada com cuidado, pois as análises químicas estão sendo realizadas para determinar se há presença e também a quantidade desses medicamentos nas fezes.

A toxicidade do ingrediente ativo fipronil já foi estudada por diversos autores, que verificaram reduções significativas na reprodução de colêmbolos *F. candida* quando expostos a solos contaminados com fipronil (San Miguel et al., 2008; Alves et al., 2014; Zortéa et al., 2017). No entanto, não há estudos que avaliem o efeito do fipronil nas fezes dos animais tratados contra parasitoses. Estudos com diferentes ingredientes ativos já foram desenvolvidos e detectaram a presença de fármacos nas fezes de bovinos. Virlov et al. (2006) ao aplicarem cipermetrina nos animais verificaram concentrações nas fezes secas em níveis de 5 mg kg^{-1} entre o primeiro e o quarto dia após o tratamento, sendo que os resíduos estavam presentes até 3 meses após uma dose única de administração em concentração de cerca de $10 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. Wardhaugh et al. (1998) encontraram concentrações de 0,4 mg de deltametrina por kg de peso seco das fezes 3 dias após o tratamento dos animais, sendo essa concentração suficiente para matar besouros coprófagos adultos. Römbke et al. (2010) avaliaram as concentrações de ivermectina em diferentes tempos

de coleta, onde no quarto dia apresentou maior taxa de excreção, em geral, as concentrações variaram 0,05 - 0,11 mg kg⁻¹ esterco, o que corresponde a cerca de 0,31 e 0,81 mg kg⁻¹ de peso seco esterco, respectivamente.

A coleta de fezes em nosso estudo em diferentes tempos foi realizada a fim de verificar o comportamento de excreção do fipronil e da torta de nim. Assim, pretendemos constatar se ocorre um período de pico principalmente do fipronil, uma vez que grande parte dos medicamentos parasiticidas possui um pico de 3 a 5 dias após o tratamento, diminuindo ao longo das semanas (Herd et al., 1996), no entanto, tal afirmação só poderá ser feita após a realização das análises químicas. Por outro lado, o fipronil é um medicamento considerado de longa ação e essa característica é determinada pelo fato de apresentar a sua formulação oleosa, o que confere absorção mais lenta a partir do local de aplicação e, portanto, prolongam a meia-vida e o tempo de ação do princípio ativo no organismo animal e, conseqüentemente, o tempo de excreção (Costa e Netto, 2012). Este fato foi verificado em estudo realizado por Forbes (2013), o qual indicou que a excreção de resíduos de eprinomectina aplicada numa formulação injetável de liberação prolongada ocorre em duas fases principais, um pico inicial ocorre dentro de alguns dias após a aplicação com um segundo pico menos pronunciado a aproximadamente 90 a 120 dias após a aplicação. Assim, dependendo do produto veterinário, pode ser necessário coletar esterco de bovinos tratados por até 5 meses, para avaliar os riscos de resíduos fecais para a comunidade biológica do solo (Floate et al., 2016).

Ao contrário do que esperávamos, as fezes dos animais que recebiam torta de nim foram aparentemente mais tóxicas que as fezes de animais tratados com fipronil. Após a torta de nim ser ingerida, a azadiractina que é um dos compostos principais do nim, passa a circular na corrente sanguínea dos animais, posteriormente é excretada pelas fezes. Outros estudos comprovaram que resíduos de nim nas fezes dos bovinos foi capaz de reduzir consideravelmente a infestação de moscas do chifre (*Haematobia irritans*), impedindo que as larvas se desenvolvessem (Silva et al., 2009). Sarker et al. (2016) também observaram reduções significativas nos ovos de parasitas nas fezes de bovinos que recebiam torta de nim em sua dieta.

Os resultados de elevada redução na reprodução de colêmbolos nas fezes dos animais que recebiam torta de nim, são diferentes dos resultados quando a torta é aplicada pura no solo (como mostra o ítem 2.2.5.4). Esse comportamento pode ser em decorrência de possíveis transformações durante o metabolismo animal, outra causa indireta pode ser em virtude da azadirac-

tina apresentar propriedades antimicrobianas e antifúngicas (Kudom et al., 2011, Ramesh et al., 2011), uma vez que os fungos são a principal fonte de alimento dos colêmbolos e a falta deles, pode ter sido a causa da redução dos organismos.

Os resultados do presente estudo devem ser avaliados com bastante cautela e todas as inferências de redução foram feitas com base na presença de resíduos de fipronil e nim nas fezes, mas essas só poderão ser aceitas após realização de análises químicas. Como conclusão prévia pode-se observar que tanto as fezes dos animais tratados com fipronil e nim reduziram significativamente a reprodução dos colêmbolos *Folsomia candida* no dia 5 e 15 após o início do tratamento, inferindo que estes tem capacidade de contaminação de ambientes terrestres. Porém, ainda é necessário mais estudos para determinar os componentes ativos presentes nas fezes e a sua dose letal em outras classes de organismos e de solos, para assim, determinar o potencial de toxicidade desses compostos ao meio ambiente.

2.4.6 REFERÊNCIAS

- Adler N, Bachmann J, Blanckenhorn WU, Floate KD, Jensen J, Römcke J. Effects of ivermectin application on the diversity and function of dung and soil fauna: Regulatory and scientific background information. *Environ. Toxicol. Chem.* 2016; 35: 1914-1923.
- Alves PRL, Cardoso EJBN, Martines AM, Sousa JP, Pasini A. Seed dressing pesticides on springtails in two ecotoxicological laboratory tests. *Ecotox. Environ. Safe.* 2014; 105: 65-71.
- Broglia-Micheletti SM, Dias NS, Valente ECN, Souza AS, Lopes DOP, Santos JM. Ação de extrato e óleo de nim no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2010; 19: 44-48.
- Comissão de Química e Fertilidade do Solo - CQFSRS/SC. Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. 10a ed. Porto Alegre: SBCS/NRS; 2004.
- Costa FM, Netto ADP. Development and application of methods for the determination of ivermectin in veterinarian medications. *Quim. Nova.* 2012; 35: 616-622.

- Floate KD, Düring RA, Hanafi J, Jud P, Lahr J, Lumaret J-P, Scheffczyk A, Tixier T, Wohde M, Römbke J, Sautot L, Blanckenhorn WU. Validation of a standard test method in four countries to assess the toxicity of residues in dung of cattle treated with veterinary medical products. *Environ. Toxicol. Chem.* 2016; 35: 1934-1946.
- Floate KD, Wardhaugh KG, Boxall ABA, Sherratt TN. Fecal residues of veterinary parasitocides: Nontarget Effects in the Pasture Environment. *Annu. Rev. Entomol.* 2005; 50: 153-79
- Forbes AB. LongRange™ (eprinomectin 5%) extended-release injection parasiticide and the utility of extended-activity antiparasitics in cattle. *Vet Parasitol.* 2013; 192: 308-312.
- Halley BA, VandenHeuvel WJA, Wislocki PG. Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. *Vet. Parasitol.* 1993; 48: 109-125.
- Herd RP, Sams RA, Ashcroft SM. Persistence of ivermectin in plasma and faeces following treatment of cows with ivermectin sustained-release, pour-on or injectable formulations. *Int. J. Parasitol.* 1996; 26: 1087-1093.
- International Organization for Standardization - ISO 11267 Soil Quality. Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. Geneva: 1999. Jochmann R, Blanckenhorn WU. Non-target effects of ivermectin on trophic groups of the cow dung insect community replicated across an agricultural landscape. *Basic. Appl. Ecol.* 2016; 17: 291-299.
- Junquera P. Fipronil for veterinary use on dogs, cats, and livestock against external parasites: fleas, lice, mites, ticks and flies. 2016. Disponível em: http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2391&Itemid=2654. Acesso em: 07 fev. 2017.
- Kudom AA, Mensah BA, Botchey MA. Aqueous neem extract versus neem powder on *Culex quinquefasciatus*: implications for control in anthropogenic habitats. *J. Insect. Sci.* 2011; 11: 1-9.
- Lumaret J.-P, Errouissi F, Floate KD, Römbke J, Wardhaugh K. A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2012; 13: 1004-1060.

- Puniamoorthy N, Schäfer MA, Römbke J, Meier R, Blanckenhorn WU. Ivermectin sensitivity is an ancient trait affecting all ecdysozoa but shows phylogenetic clustering among sepsid flies. *Evol. Appl.* 2014; 7: 548-554.
- Ramesh KS, Susan E, Devanand PF. Bioactive constituents and antimicrobial activity of cell cultures of *Azadirachta indica*. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 2011; 2: 617-628.
- Römbke J, Krogh KA, Moser T, Scheffczyk A, Liebig M. Effects of the veterinary pharmaceutical ivermectin on soil invertebrates in laboratory tests. *Arch. Environ. Con. Tox.* 201; 58: 332-340.
- San Miguel A, Raveton M, Lempérière G, Ravanel P. Phenylpyrazoles impact on *Folsomia candida* (Collembola). *Soil. Biol. Biochem.* 2008; 40: 2351-2357.
- Sarker MAH, Khan MAS, Rashid MH, Islam MA. Effect of *Azadirachta indica* and *Annona reticulata* leaf as natural anthelmintics and their effects on performances of zebu cow under subsistence farming condition in Bangladesh. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 2016; 6: 16-21.
- Silva C B, Brito GR, Sanavria A, Soares JPG. Avaliação da utilização de Nim (*Azadirachta indica*) no controle parasitário em bovinos de produção leiteira em sistema orgânico. *Embrapa Agrobiologia*, 2009; 36p.
- United States Department Of Agriculture—USDA, 2014. Keys to Soil Taxonomy. Natural Resource Conservation Service, Twelfth Ed., p.36.
- Virilouvet G, Bichon E, André F, Bizec B. Faecal excretion of cypermethrin following a single pour-on administration. *Toxicol. Environ. Chem.* 2006; 88: 489-499.
- Wall R, Beynon S. Area-wide impact of macrocyclic lactone parasiticides in cattle dung. *Med. Vet. Entomol.* 2012; 26: 1-8.
- Wardhaugh KG, Longstaff BC, Lacey MJ. Effects of residues of deltamethrin in cattle faeces on the development and survival of three species of dung-breeding insect. *Aust Vet J.* 1998; 76: 273-280.
- Zortéa T, Segat JC, Maccari AP, Sousa JP, Silva AS, Baretta D. Toxicity of four veterinary pharmaceuticals on the survival and reproduction of *Folsomia candida* in tropical soils. *Chemosphere.* 2017; 173: 460-465

Figuras

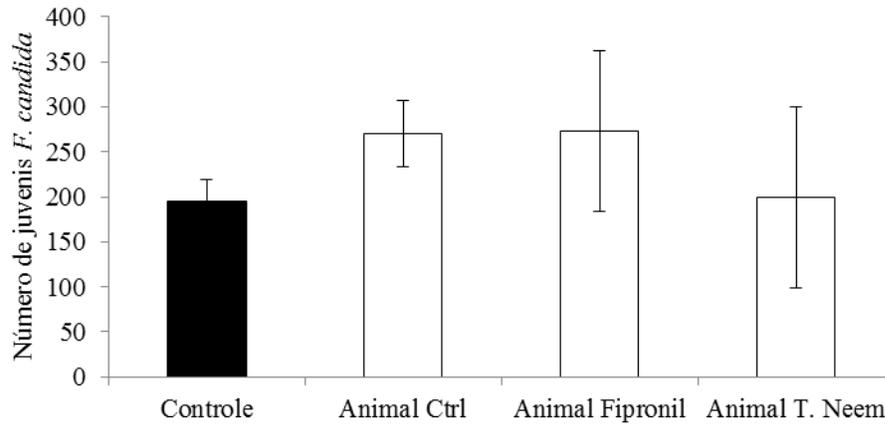


Figura 2.11 - Número médio de juvenis de colêmbolos *Folsomia candida* expostos a solo contaminado com 4 Mg ha⁻¹ de dejetos de bovinos no dia 0 (sem aplicação de medicamentos) em Neossolo Quartzarênico Órtico típico. (⊥) desvio-padrão ($n = 8$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos ($p < 0,05$; *one-way* ANOVA seguido de teste de Dunnett).

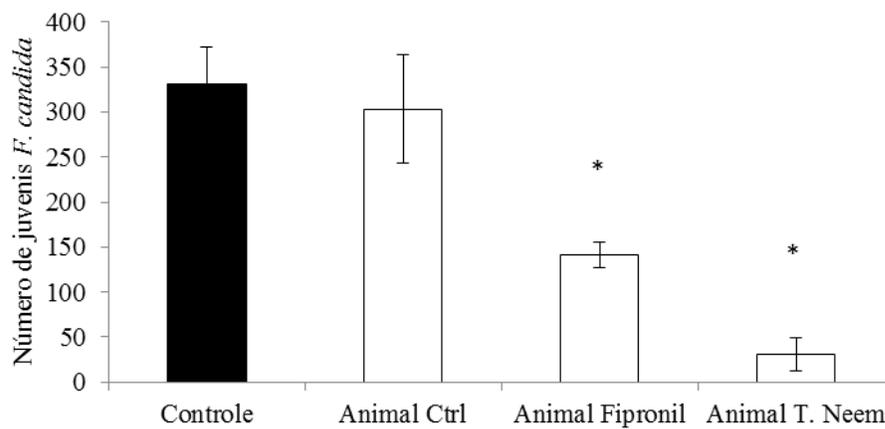


Figura 2.12 - Número médio de juvenis de colêmbolos *Folsomia candida* expostos a solo contaminado com 4 Mg ha⁻¹ de dejetos de bovinos 5 dias após aplicação de medicamentos fipronil e torta de nim em Neossolo Quartzarênico Órtico típico. (⊥) desvio-padrão ($n = 8$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos ($p < 0,05$; *one-way* ANOVA seguido de teste de Dunnett).

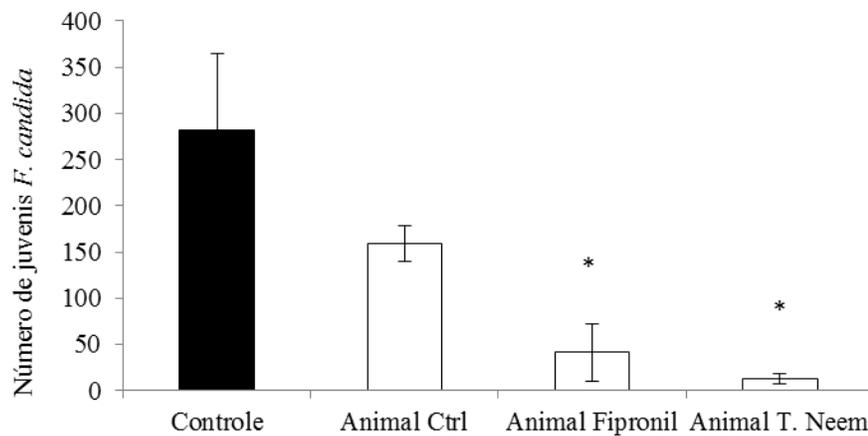


Figura 2.13 - Número médio de juvenis de colêmbolos *Folsomia candida* expostos a solo contaminado com 4 Mg ha^{-1} de dejetos de bovinos 15 dias após aplicação de medicamentos fipronil e torta de nim em Neossolo Quartzarênico Órtico típico. (\top) desvio-padrão ($n = 8$). Asteriscos (*) indicam diferença significativa para número médio de juvenis e número médio de adultos ($p < 0,05$; *one-way* ANOVA seguido de teste de Dunnett).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados encontrados durante as quatro etapas do desenvolvimento da dissertação foi possível perceber que a presença de resíduos de medicamentos veterinários no solo pode afetar negativamente organismos edáficos, que possuem papel importante na manutenção de sistemas agrícolas. O fipronil e seus metabólitos possui elevada toxicidade principalmente aos colêmbolos, já os produtos a base de nim (torta e extrato) quando aplicado diretamente no solo parecem ser inofensivos aos organismos (minhocas, colêmbolos e enquitreídeos). Além disso, as diferenças de toxicidade dos compostos foi bem evidente em função do tipo de solo, onde solos com texturas arenosas (Solo Artificial Tropical e Neossolo Quartzarênico Órtico típico) apresentaram níveis de toxicidade maiores em comparação com o solo de textura mais argilosa Latossolo Vermelho distrófico.

No entanto ao se designar os efeitos ecotoxicológicos de medicamentos veterinários é de extrema importância se avaliar a excreção destes pelas fezes dos animais e os seus efeitos, uma vez que surpreendentemente ao avaliar as fezes dos animais tratados com fipronil e nim observou-se reduções significativas na reprodução de colêmbolos para ambos os compostos, sendo que o nim apresentou redução acima de 90% no número de juvenis, tal fato pode ser atribuído a transformações dos compostos no organismo animal, que após a excreção se torna mais tóxico que o próprio composto original.

Com os resultados obtidos nesse projeto houve uma contribuição em entender os efeitos causados por alguns medicamentos veterinários sobre três organismos chave em estudos ecotoxicológicos e as diferenças de toxicidades em relações os tipos de solos. Ao final, está prevista a publicação dos resultados sob a forma de artigos científicos em revistas indexadas nos principais bancos de dados.

4 REFERÊNCIAS

- ABBAS, R.Z., et al. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 203, n. 1, p. 6-20, 2014.
- ADENUBI, O.T., et al. Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: A review. **South African Journal of Botany**, Cidade do Cabo, v. 105, n.2, p. 178-193, 2016.
- AGUIAR-MENEZES, E. L. **Inseticidas Botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58 p.
- AMORIM, M.J.B.; PEREIRA, C.; MENEZES-OLIVEIRA, V.B.; CAMPOS B.; SOARES A.M.V.M.; LOUREIRO, S. Assessing single and joint effects of chemicals on the survival and reproduction of *Folsomia candida* (Collembola) in soil. **Environmental Pollution**, v. 160, p. 145-52, 2012.
- AN, Y.J.; KIM, S. W.; LEE, W. M. The collembola *Lobella sokamensis* juvenile as a new soil quality indicator of heavy metal pollution. **Ecological Indicators**, Oxford, v. 27, p. 56 - 60, 2013.
- ANDRÉA, M. M. Abordagens em ecotoxicologia terrestre no Brasil. In: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 882., 2012. Porto de Galinhas - PE. **Anais...** Porto de Galinhas: Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia, 2012. p. 1
- ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA 2014-2015. Disponível em: http://www.grupogaz.com.br/editora/anuarios/lista_categoria/cat:22. Acesso em: 10 jun. 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES - ABIEC. Pecuária brasileira. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp>. Acesso em: 24 Set. 2015.
- AUBRY, P.; GEALE, D. W. A review of bovine anaplasmosis. **Transbound. Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 58, p. 1-30, 2011.
- AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY (1997). Safety of Fipronil in dogs and cats. A review of literature. 21p. Disponível em: http://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/15191-fipronil-prf-vol2-animal-safety-literature_0.pdf . Acesso em: 24 Set. 2015
- AZEVEDO, F.A. de.; CHASIN A.A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos, São Paulo: RiMa, 2003. 322 p.
- BAKKALI, F., et al. Biological effects of essential oils - a review. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BALANDRIN, M. F., et al. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science**, Washington, v. 228, p. 1154 - 1160, 1985.
- BARBER, S.; ALVINERIE, M. Comment on “A comparison of persistent anthelmintic efficacy of topical formulations of doramectin, eprinomectin, ivermectin and moxidectin against naturally acquired nematode infections of beef calves” and problems associated with mechanical transfer (licking) of endectocides in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.112, n. 3, p. 255-571, 2003.
- BÁRTÍKOVÁ, H.; PODLIPNÁ, R.; SKÁLOVÁ, L. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. **Chemosphere**, Oxford, v. 144, p. 2290-2301, 2016.
- BENELLI, G., et al. Neem (*Azadirachta indica*): towards the ideal insecticide? **Natural Product Research**, v. 31, n. 4, p. 369-386, 2017.

- BEYNON, S. A. Potential environmental consequences of administration of anthelmintics. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 189, p. 113-124, 2012.
- BOBE, A., et al. Behaviour of fipronil in soil under sahelian plain field conditions. **Pesticide Science**, Washington, v. 52, p. 275-281. 1998a.
- BOBE, A., et al. Kinetics and mechanisms of abiotic degradation of fipronil (hydrolysis and photolysis). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2834-2839. 1998b.
- BOTINELLI, N., et al. Why is the influence of soil macrofauna on soil structure only considered by soil ecologists? **Soil & Tillage Research**, v. 146, p. 118-124, 2015.
- BOXALL, A.B.A., et al. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n. 6, p. 2288-2297, 2006.
- BRASILIAN CATTE YEARBOOK. With an eye on the steak. Ed. Gazeta. p. 24-26, 2015.
- BRONW, G. G.; DOMÍNGUEZ, J. Uso das minhocas como bioindicadoras ambientais: princípios e práticas. **Acta Zoológica Mexicana**, n. 2, p. 1-18, 2010.
- BROOKS, B.W., MAUL, J., BELDEN, J., Emerging contaminants: antibiotics in aquatic and terrestrial ecosystems. In: JORGENSEN, S. E. (Ed.), **Encyclopedia of Ecology**. Elsevier Press, London, UK. 2007, In press.
- BUCH, A. C., et al. Ecotoxicity of mercury to *Folsomia candida* and *Proisotoma minuta* (Collembola: Isotomidae) in tropical soils: Baseline for ecological risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 127, p. 22-29, 2016.
- CAMPOS, E. V. R. et al., Neem Oil and Crop Protection: From Now to the Future. **Frontiers in Plant Science**. Bethesda v. 7, p 1-8, 2016.
- CAMPOS, R.N.S., et al. Óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*. **Archivos Zootecnia**, v. 61, p. 67-78. 2012.
- CHAGAS, A. C. S., et al. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 427-432, 2016.
- CHELINHO, S.; DOMENE, X.; ANDRÉS, P.; NATAL-DALUZ, T.; NORTE, C.; RUFINO, C.; LOPES, I.; CACHADA, A.; ESPÍNDOLA, E.; RIBEIRO, R.; DUARTE, A.C.; SOUSA, J;P. Soil microarthropod community testing: A new approach to increase the ecological relevance of effect data for pesticide risk assessment. **Applied Soil Ecology**. v. 83, p. 200- 209, 2013b.
- CHELINHO, S.; DOMENE, X.; CAMPANA, P.; ANDRÉS, P.; RÖMBKE, J.; SOUSA, J.P. Toxicity of phenmedipham and carbendazim to *Enchytraeus crypticus* and *Eisenia andrei* (Oligochaeta) in Mediterranean soils. **Journal of Soils and Sediments**, v. 14, p.584-599, 2013a.
- CHIANESE, G., et al. Antiplasmodial triterpenoids from the fruits of neem, *Azadirachta indica*. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 1448-1452, 2010.
- CID, Y. P., et al. Injectable fipronil for cattle: Plasma disposition and efficacy against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 220, p. 4-8, 2016.
- COLE, L.M.; NICHOLSO, R.A.; CASIDA, J.E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pesticides Biochemistry Physiology**, v. 46, n. 1, p. 47-54, 1993.
- COOPER, K. M., et al. Potential impacts of climate change on veterinary medicinal residues in livestock produce: An island of Ireland perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v. 44, n.1, p.21-35, 2014.

- DAUGHTON, C. G., Pharmaceuticals in the environment: sources and their management. Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle. In: BARCELO, D.; Petrovic, M. A. B.; Wilson & Wilson's, D. (Eds). **Comprehensive Analytical Chemistry Series**, 50. Elsevier Science, 2007, p.564.
- DAVEY, R. B., et al. Therapeutic and persistent efficacy of fipronil against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 74, p. 261-276, 1998.
- DAY, K. E.; SCOTT, I. M. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. **Aquatic Toxicology**, 18: 101-114, 1990.
- DI NICA, V., et al. RANKVET: A new ranking method for comparing and prioritizing the environmental risk of veterinary pharmaceuticals. **Ecological Indicators**, Oxford, v. 52, p. 270-276, 2015.
- DILSHAD, I.; SIDDIQUI, B. S.; FAIZI, S. Two new degraded triterpenoids and a novel seconrabetane diterpene from the root bark of *Azadirachta indica*. *Helvetica Chimica Acta*, v. 98, p. 135-142, 2015.
- EISENHAEUER, N., et al. Impacts of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus intraradices*) on plant performance are not interrelated. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 561-567, 2009.
- ELLSE, L.; WALL, R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 28, p. 233-243, 2014.
- FLOATE, K.D., et al. Fecal residues of veterinary parasiticides: nontarget effects in the pasture environment. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v. 50, p. 153-179, 2005
- FÖRSTER, M., et al. Sequestration of manure-applied sulfadiazine residues in soils. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 43, p. 1824-1830, 2009.
- FOUNTAIN, M. T; HOPKIN, S. P. *Folsomia candida* (Collembola): A "Standard" Soil Arthropod. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 5, p. 20-22, 2005.
- GARBOUI, S. S. **Plant-derived chemicals as tick repellents**. 2008. 61f. Dissertation (Zoology Master) - Department of Evolutions Genomics and Systematics. Uppsala University, Uppsala - Sweden.
- GEORGE, J. E.; POUND, J. M.; DAVEY, R. B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. **Parasitology**, v. 129, p. S353-S366, 2004.
- GILBERT, L., et al. Environmental risk factors for *Ixodes ricinus* ticks and their infestation on lambs in a changing ecosystem: Implications for tick control and the impact of woodland encroachment on tick-borne disease in livestock. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 237, p. 265-273, 2017.
- GREENSLADE, P.; VAUGHAN, G. T. A comparison of Collembola species for toxicity testing of Australian soils. **Pedobiologia**, v. 47, n. 2, p. 171-179, 2003.
- GRISI, L., et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.
- GRUNDY, D.L.; STILL, C.C. Inhibition of acetylcholinesterases by pulegone 1, 2-epoxide. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 23, p. 383-388, 1985.
- GUNASEKARA, A.S.; TROUNG, T. **Environmental fate of fipronil**. California Environmental Protection Agency Sacramento, 2007. 28p.

- HAINZL, D.; CASIDA, J.E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 12764-12767, 1996.
- HAINZL, D.; COLE, L.M.; CASIDA, J.E. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. **Chemical Research in Toxicology** v. 11, p. 1529-1535, 1998.
- HALLEY, B.A.; VANDENHEUVEL, W.J.A.; WISLOCKI, P.G. Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 48, n. 1-4, p.109-25, 1993.
- HAVLICEK, E. Soil biodiversity and bioindication: From complex thinking to simple acting. **European Journal of Soil Biology**, v. 49, p. 80-84, 2012.
- HIGGINS, R.A.; SLODERBECK, P.E.; BROOKS, H.L. **Field corn insect management for 2001**. Kansas: Kansas State University, 2001. 24p.
- HOKE, R.; HUGGETT, D.; BRASFIELD, S.; BROWN, B.; EMBRY, M.; FAIRBROTHER, A.; KIVI, M.; PAUMEN, M. L.; PROSSER, R.; SALVITO, D.; SCROGGINS, R. Review of laboratory-based terrestrial bioaccumulation assessment approaches for organic chemicals: Current status and future possibilities. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 12, n. 1, p. 109-122, 2016
- ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, p. 45-66, 2006.
- JONES, O. A.; VOULVOULIS, N.; LESTER, J.N. Potential impact of pharmaceuticals on environmental health. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 81, n. 10, p. 768-769, 2003.
- JONSSON N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 1-2, p. 1-10, 2006.
- JUNQUERA, P. 2016. Fipronil for veterinary use on dogs, cats, and livestock against external parasites: fleas, lice, mites, ticks and flies. Disponível em: <
http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2465&Itemid=2733> . Acesso em: 11. 01. 2017.
- KEANE, S.; RYAN, M.F. Purification, characterisation and inhibition of mono-terpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria melonella*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, p. 1097-1104, 1999.
- KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2008.
- KLINGEN, I.; VAN DUIJVENDIJK, G. Biological control of *Ixodes ricinus* by tick pathogens and invertebrates. In: BRAKS, M. (Ed.), **Ecology and Control of Vector Borne Diseases**. v. 5: Ecology of *Borrelia burgdorferi*, and the Prevention of Lyme Borreliosis. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 2016, 462p.
- LEW-TABOR, A. E.; RODRIGUEZ VALLE, M. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. **Ticks and Tick-borne Disease**, v. 7, p. 573-585, 2016.
- LIESS, M.; BEKETOV, M. Traits and stress: keys to identify community effects of low levels of toxicants in test systems. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 6, p. 1328-1340, 2011.

- LUMARET, J.P., et al. A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in the terrestrial and aquatic environment. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, p. 1004-1060, 2012.
- MANDAL, K.; SINGH, B. Persistence of fipronil and its metabolites in sandy loam and clay loam soils under laboratory conditions. **Chemosphere**, Oxford, v. 91, p. 1596-1603, 2013.
- MANZETTI, S.; GHISI, R. The environmental release and fate of antibiotics. **Marine Pollution Bulletin**, v. 79, p. 7-15, 2014.
- MARTINEZ, S. S. **O Nim, *Azadiractina indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: IAPAR, 2002. 142 p.
- MARTÍNEZ-CARBALLO, E., et al. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. **Environmental Pollution**, London, v. 148, n. 2, p. 570-579, 2007.
- MARTINS, A. P. **Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrado em dose única a ratos**. 2009. 86f. Dissertação (Mestrado Ciências) - Departamento de Patologia Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.
- MARTINS, J. R. S. **Carrapato *Boophilus microplus* (Can 1887) (Acari: Ixodidae) resistente a ivermectina, mixidectina e doramectina, Rio Grande do Sul**. 2006. 74f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- MATAMOROS, V.; BAYONA, J. Elimination of Pharmaceutical and personal Care Products in Subsurface Flow Constructed Wetlands. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 40, n. 18, p. 811-816, 2006.
- MELO, S.A.S., et al. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009.
- MIYAZAWA, M.; WATANABE, H.; KAMEOKA, H. Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a pmenthane skeleton. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 677-679, 1997.
- MOLENTO, M. Resistência parasitaria em helmintos de eqüídeos e propostas de manejo. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1469-1477, 2005.
- NATHAN, S.S.; HISHAM, A.; JAYAKUMAR, G.; Larvicidal and growth inhibition of the malaria vector *Anopheles stephensi* by triterpenes from *Dysoxylum malabaricum* and *Dysoxylum Beddomei*. **Fitoterapia**, v. 79, n. 2, p. 106-111, 2008.
- NGIM, K. K.; CROSBY, D. G. Abiotic process influencing fipronil and desthiofipronil dissipation in California, USA, rice fields. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 972-977, 2001.
- OLIVEIRA - FILHO, L. I. et al., Avaliação Ecotoxicológica do Resíduo de Mineração de Carvão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 1806-1813, 2015.
- OLIVEIRA, P. R. **Avaliação dos efeitos do fipronil (ingrediente ativo do frontline®) nos ovários de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (acari: Ixodidae) e no sangue periférico de roedores**. 2010. p.173f. Tese (Doutorado e Biociências). Universidade Estadual Paulista - Rio Claro, São Paulo. 2010.
- OLIVEIRA-FILHO, L. I.; BARETTA, D. Por que devemos nos importar com os colêmbolos edáficos? **Revista Scientia Agraria**, v. 17, n. 2, p. 21-40, 2016.
- PAZINATO, R., et al. Antiparasitic Resistance of Different Populations of ticks (*Rhipicephalus microplus*) in the Western of Santa Catarina State, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 42, n. 1, p. 1-6, 2014.

- PAZINATO, R., et al. *In vitro* effect of seven essential oils on the reproduction of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 6, p. 1029-1034, 2016.
- PAZINATO, R., et al. *In vitro* effect of seven essential oils on the reproduction of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Journal of Advanced Research**, Bethesda. v. 7, n. 6, p. 1029-1034, 2016.
- PELOSI, C.; BAROT, S.; CAPOWIEZ, Y.; HEDDE, M.; VANDENBULCKE, F.; Pesticides and earthworms. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 34, p.199-228, 2013.
- PEREIRA, M.C., et al. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: biologia, controle e resistência***. São Paulo: MedVet, 2008, 169p.
- PESTICIDE ACTION NETWORK- UK, 2000. **Active ingredient Fact Sheet: Fipronil**, Pesticides News London, 48:20-22.
- RAMESH, A.; BALASUBRAMANIAN, M. Kinetics and hydrolysis of fenamiphos, fipronil, and trifluralin in aqueous buffer solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3367-3371, 1999.
- RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**, v. 29, p. 913-920, 2010.
- RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.
- RODRIGUES D. S.; LEITE, R. C. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1570-1572, 2013.
- ROMERO, C.G. **Fitoterapia em Ganaderia ecológica/orgânica flora medicinal de Espanha y Panamá**. Editorial Agrícola Española. Madrid. 2008, 110p.
- ROSSETO, R.; SAMBUICHI, R. H. R. **Diagnóstico: dos Resíduos Sólidos do Setor Agro-silvopastoris - Resíduos sólidos inorgânicos**. IPEA, Brasília. 2013.
- RUTGERS, M., A. J., et al., Biological measurements in a nationwide soil monitoring network. **European Journal of Soil Science**. v. 60, p. 820-832, 2009.
- RYAN, M.F.; BYRNE, O. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholineesterase. **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, p. 1965-1975, 1998.
- SALMON, S., et al. Linking species, traits and habitat characteristics of Collembola at European scale. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 75, p. 73-85, 2014.
- SANDIFER, R. D.; HOPKIN, S. P. Effects of temperature on the relative toxicities of Cd, Cu, Pb, and Zn to *Folsomia candida* (Collembola). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 37, p. 125-130, 1997.
- SARTOR, I. F.; SANTARÉM, V.A. Agentes empregados ao controle de ectoparasitos. In: SPINOLA, H. S.; GORNIA, S. L.; BERNARDI, M. M., ed. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Kooga, 2006. p. 567-583.
- SIDDQUI, B.S., et al. Variation of major limonoids in *Azadirachta indica* fruits at different ripening stages and toxicity against *Aedes aegypti*. **Natural Product Communications**, v. 4, p. 473-476, 2009.
- SILVA, A. M., et al. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitas na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 1477-1482, 2010.

- SILVA, F. F., et al. Avaliação comparativa da eficácia de fitoterápicos e produtos químicos carrapaticidas no controle do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) por meio do bio-carrapaticidograma. **Medicina Veterinária**, v. 2, n. 3, p. 1-8, 2008.
- SILVA, J. B.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Low genetic diversity of *Anaplasma marginale* in calves in an endemic area for bovine anaplasmosis in the state of São Paulo, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n.1, p. 20-25, 2016.
- SINDAN - **Sindicato Nacional das Indústrias de Produtos para Saúde Animal. O setor: mercado**. Disponível em: <http://www.sindan.org.br>. Acesso em: 05 mai. 2016.
- SMIT, C.E.; VAN GESTEL, C.A.M. Comparison of the toxicity of zinc for the springtail *Folsomia candida* in artificially contaminated and polluted field soils. **Applied Soil Ecology**, v. 3, p. 127-136, 1996.
- SOUSA, J.P., et al. Changes in Collembola richness and diversity along a gradient of land-use intensity: a pan European study. **Pedobiologia**, v.50, p. 147-156, 2006.
- STEVENS, M.M.; HELLIWELL, S.; WARREN, G.N. Fipronil seed treatments for the control of chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in aerially-sown rice crops. **Field Crops Research**, v. 57, n. 2, p. 195-207, 1998.
- STOTZER, E. S., et al. Impacto econômico das doenças parasitárias na pecuária. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 8, n. 3, p. 98-121, 2014.
- STURM, A., et al. Potential use of cholinesterase in monitoring low levels of organophosphates in small stream: natural variability in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and relation to pollution. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 18, p. 194-200, 1999.
- SUAREZ, M., et al. High impact and effectiveness of Gavac™ vaccine in the national program for control of bovine ticks *Rhipicephalus microplus* in Venezuela. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 187, p. 48-52, 2016.
- TEREKHOVA, V.A. Soil Bioassay: Problems and Approaches. **Eurasian Soil Science**, v. 44, p. 173-179, 2011.
- TINGLE, C.C., et al. Fipronil: Environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 176, p. 1-66, 2003.
- TOLLS, J. Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review . **Environmental Science & Technology**, Easton, 35, p. 3397-3406, 2001.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE CATTLE - USDA Economics, Statistics and Market Information System. Ed. 2016.
- UNITES STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **New pesticide fact sheet**. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances - USEPA. Whashington, 1996.
- UNITES STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Prevention Pesticides and Toxic Substances - USEPA. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Whashington, 1998.
- VASSILIS, L., et al. Mobility of pharmaceutical compounds in the terrestrial environment: Adsorption kinetics of the macrocyclic lactone eprinomectin in soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 144, p. 1201-1206, 2016.
- VIVAN, M. P. **Uso do cinamomo (*Melia azedarach*) como alternativa aos agroquímicos no controle do carrapato bovino (*Boophilus microplus*)**. 2005. 85f. Dissertação

- (Mestrado em Agroecossistemas) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - Santa Catarina, 2005.
- VOLPATO, A.; BARETTA, D.; ZORTÉA, T.; CAMPIGOTTO, G.; GALLI, G. M.; GLOMBOWSKY, P.; SANTOS, R. C.V.; QUATRIN, P. M.; OURIQUE, A. F.; BALSISSEIRA, M.D.; STEFANI, L. M.; SILVA, A. S. Larvicidal and insecticidal effect of *Cinnamomum zeylanicum* oil (*pure and nanostructured*) against mealworm (*Alphitobius diaperinus*) and its possible environmental effects. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 19, p. 1159-1165, 2016a.
- VOLPATO, A.; LORENZETTI, W. R.; ZORTÉA, T.; GIOMBELLI, L. C. D. D.; BARETTA, D.; SANTOS, R. C. V.; VAUCHER, R. A.; RAFFIN, R. P.; SOUZA, M. E.; STEFANI, L. M.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; DA SILVA, A. S. *Melaleuca alternifolia* essential oil against the lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*) and its possible effect on the soil fauna. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v. 18, p. 41-46, 2016b.
- WALL, R.; BEYNON, S. Area-wide impact of macrocyclic lactone parasiticides in cattle dung. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 26, p. 1-8, 2012.
- WANG, H., et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. **Nature Medicine**, New York, v. 10, p. 1216-1221, 2004.
- WELLINGTON, K. W., et al. Further studies on South African plants: Acaricidal activity of organic plant extracts against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 234, p. 10-12, 2017.
- WINCK, B. R., et al. Relationship between land-use types and functional diversity of epigeic Collembola in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 109, p. 49-59, 2017.
- ZAGATTO, P.A. **Ecotoxicologia**. In: Zagatto, P.A.; Bertoletti, E. Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. São Carlos, RiMa, p. 1-12, 2006.
- ZHANG, H., et al. Residues and risks of veterinary antibiotics in protected vegetable soils following application of different manures. **Chemosphere**, Oxford, v. 152, p. 229-237, 2016.
- ZHAO, X., et al. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 310, n. 1, p. 192-201, 2004.



Toxicity of four veterinary pharmaceuticals on the survival and reproduction of *Folsomia candida* in tropical soils



Talyta Zortéa^a, Julia C. Segat^b, Ana Paula Maccari^b, José Paulo Sousa^c,
Aleksandro S. Da Silva^a, Dilmar Baretta^{a,*}

^a Department of Animal Science and Graduate Program of Animal Science, Centro de Educação Superior do Oeste da Universidade do Estado de Santa Catarina (UNESC), Chapecó, Brazil

^b Department of Soil Science, Centro de Ciências Agrovetemárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (UNESC), Lages, SC, Brazil

^c Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

HIGHLIGHTS

- Antiparasitic drugs are commonly used on farms.
- Veterinary compounds may have potentially toxic to soil collembolans.
- The collembola survival rate was affected by fipronil and fluzarone.
- Effects on reproduction were also observed for ivermectin and closantel.
- These compounds enter the environment as the excreta of treated animals.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 September 2016

Received in revised form

2 January 2017

Accepted 12 January 2017

Available online 12 January 2017

Handling Editor: Jim Lazochak

Keywords:

Soil fauna

Ivermectin

Fipronil

Fluzarone

Closantel

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of veterinary pharmaceuticals (VPs) used to control endo- and ectoparasites in ruminants, on the survival and reproduction of the collembolan species *Folsomia candida*. Standard ecotoxicological tests were conducted in Tropical Artificial Soil and the treatments consisted of increasing dosages of four commercial products with different active ingredients: ivermectin, fipronil, fluzarone and closantel. Ecotoxicological effects were related to the class and mode of action of the different compounds. Fipronil and ivermectin were the most toxic compounds causing a significant reduction in the number of juveniles at the lowest doses tested (LOEC_{reprod} values of 0.3 and 0.2 mg kg⁻¹ of dry soil, respectively) and similar low EC₅₀ values (fipronil: 0.19 mg kg⁻¹ dry soil, CI_{95%} 0.16–0.22; ivermectin: 0.43 mg kg⁻¹ dry soil, CI_{95%} 0.09–0.77), although the effects observed in the former compound were possibly related to a low adult survival (LC₅₀ of 0.62 mg kg⁻¹ dry soil; CI_{95%}: 0.25–1.06). For the latter compound no significant lethal effects were observed. Fluzarone caused an intermediate toxicity (EC₅₀ of 3.07 mg kg⁻¹ dry soil, CI_{95%}: 2.26–3.87), and also here a decrease in adult survival could explain the effects observed at reproduction. Closantel, despite showing a significant reduction on the number of juveniles produced, no dose-response relationship nor effects higher than 50% were observed. Overall, all tested compounds, especially ivermectin, when present in soil even at sub-lethal concentrations, can impair the reproduction of collembolans and possibly other arthropods. However, the actual risk to arthropod communities should be further investigated performing tests under a more realistic exposure (e.g., by testing the dung itself as the contaminated matrix) and by deriving ecotoxicologically relevant exposure concentration in soil derived from the presence of cattle dung.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cattle parasitism by both endo- and ectoparasites results in large financial losses for the cattle breeding industry worldwide,

* Corresponding author.

E-mail address: dilmar.baretta@unesc.br (D. Baretta).



CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal da UDESC analisou o(s) projeto(s):

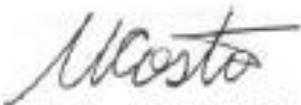
Protocolo: 1.27.15

Título: Avaliação ambiental dos resíduos do fármaco fipronil e neem em dejetos de bovinos: identificação dos efeitos sobre a fauna edáfica por meio de ensaios ecotoxicológicos.

Coordenador/Pesquisador: Dilmar Baretta

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) APROVOU o(s) projeto(s) acima relacionado(s) em seus aspectos éticos e metodológicos, para utilização de animais em pesquisa, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa no Brasil.

Lages, 02 de outubro de 2015.


Prof. Ubirajara Maciel da Costa
Coordenador do CETEA/UEDESC