



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Tecnologia



Maria Gabriéla Caxias Ribeiro

**Avaliação ecotoxicológica da ivermectina no solo:
efeitos para microrganismos, mesofauna e plantas**

Limeira/SP

2023

Maria Gabriéla Caxias Ribeiro

**Avaliação ecotoxicológica da ivermectina no solo:
efeitos para microrganismos, mesofauna e plantas**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas (FT/UNICAMP) como parte dos requisitos para a conclusão do curso de Tecnologia em Saneamento Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Cassiana Maria Reganhan Coneglian

Este trabalho corresponde à versão final do trabalho de conclusão de curso defendido por Maria Gabriéla Caxias Ribeiro e orientado pela Profa. Dra. Cassiana Maria Reganhan

Limeira/SP

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Tecnologia
Luiz Felipe Galeffi - CRB 8/10385

R354a Ribeiro, Maria Gabriela Caxias, 2001-
Avaliação ecotoxicológica da ivermectina no solo : efeitos para
microrganismos, mesofauna e plantas / Maria Gabriela Caxias Ribeiro. – Limeira,
SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Cassiana Maria Reganhan Coneglian.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Tecnologia.

1. Toxicologia ambiental. 2. Ivermectina. 3. Solos - Poluição. I. Reganhan-
Coneglian, Cassiana Maria, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Tecnologia. III. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: Ecotoxicological evaluation of ivermectin in soil: effects to
microorganisms, mesofauna and plants

Palavras-chave em inglês:

Environmental toxicology

Ivermectin

Soil pollution

Área de concentração: Saneamento Ambiental

Titulação: Tecnólogo

Banca examinadora:

Cassiana Maria Reganhan Coneglian [Orientador]

Marta Siviero Guilherme Pires

Marcela Ravanelli Martins

Data de entrega do trabalho definitivo: 30-06-2023

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comissão julgadora da sessão pública de defesa de trabalho de conclusão de curso para o grau de Tecnologia em Saneamento Ambiental, a que se submeteu a aluna Maria Gabriela Caxias Ribeiro, em 29 de junho de 2023 na Faculdade de Tecnologia - FT/UNICAMP, em Limeira/SP.

Profa. Dra. Cassiana Maria Reganhan Coneglian

Presidente da Comissão Julgadora

Profa. Dra. Marta Siviero Guilherme Pires

Faculdade de Tecnologia da UNICAMP

Msc. Marcela Ravanelli Martins

Faculdade de Tecnologia da UNICAMP

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Tecnologia.

Agradecimentos

À minha família, meu eterno agradecimento por seu amor incondicional, encorajamento e apoio em todas as fases da minha vida acadêmica. Seu suporte emocional foi crucial para a minha motivação e perseverança.

Gostaria de expressar minha gratidão à minha orientadora, Dra. Cassiana Maria Reganhan Coneglian, pela orientação dedicada, paciência e sabedoria compartilhada ao longo deste processo. Seu conhecimento profundo e entusiasmo pela pesquisa foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Meus agradecimentos se estendem aos professores e responsáveis pelo Laboratório de Microbiologia, Laboratório de Estudos Avançados em Microbiologia e Laboratório Físico-Químico da Faculdade de Tecnologia da UNICAMP, que contribuíram de alguma forma para que essa pesquisa fosse realizada. Agradeço especialmente aos técnicos do laboratório Gilberto de Almeida Anjaína F. Albuquerque e às pesquisadoras da pós-graduação em tecnologia e engenharia ambiental, por compartilharem seu conhecimento e por incentivarem meu interesse pela pesquisa científica.

Não posso deixar de agradecer ao meu colega João Lucas Oliveira, pelo auxílio e apoio, à minha colega de área de pesquisa Bruna Santos, pelo auxílio e compartilhamento de conhecimento, e aos bolsistas SAE do Laboratório de Microbiologia pelo auxílio na reta final dos experimentos.

Agradeço também aos demais membros da banca examinadora, Dra. Marta Siviero Guilherme Pires e Msc. Marcela Ravanelli Martins, por dedicarem seu tempo e expertise para avaliar este trabalho e fornecer valiosas sugestões e críticas construtivas.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho, meu sincero agradecimento. Sem vocês, este TCC não teria sido concluído com sucesso. Espero que este trabalho possa contribuir para a ampliação do conhecimento na área da microbiologia e da ecotoxicologia e para o avanço da ciência como um todo.

Muito obrigada a todos!
Maria Gabriéla Caxias Ribeiro

Resumo

A crescente demanda por recursos oriundos da pecuária tem impulsionado a busca por tecnologias e métodos que visam melhorar a qualidade de vida dos animais criados nessa atividade, como o uso de medicamentos veterinários para prevenir e reduzir o risco de doenças e infecções. No Brasil, a ivermectina é um desses medicamentos amplamente utilizados e os animais excretam essa substância junto com as fezes, podendo afetar a biota do solo onde é depositada. Com o objetivo de avaliar a toxicidade da ivermectina, este projeto consistiu na realização de testes de toxicidade em solo artificial tropical, utilizando o medicamento comercial injetável produzido pela empresa Merial Saúde Animal LTDA, contendo ivermectina a 1%. Para a avaliação da toxicidade na mesofauna, foi utilizado o organismo-teste *Enchytraeus crypticus*, que desempenha um papel fundamental na decomposição da matéria orgânica do solo, amplamente empregado em estudos de ecotoxicologia devido à sua sensibilidade às alterações ambientais. Para avaliar a fitotoxicidade do composto, utilizou-se sementes de *Eruca sativa* (rúcula), da variedade Antonella e *Lactuca sativa* (alface) da variedade Lisa, adquiridas na empresa ISLA®, comumente avaliadas em testes de toxicidade de compostos químicos por refletir a resposta das plantas à condições adversas, avaliando-se o comprimento e o número de sementes germinadas. Para avaliar os efeitos para a comunidade microbiana do solo, aplicou-se o método respirométrico de Bartha e Pramer, que avalia a atividade microbiana do solo, mediante o processo de respiração dos microrganismos, pela geração de CO₂ em solos expostos a diferentes concentrações de substâncias químicas. Com os resultados obtidos nos testes aplicados neste estudo, notou-se que a ivermectina acarreta em graves efeitos adversos para a mesofauna, mas sem efeitos significativos para a germinação das sementes analisadas e apresentou lenta biodegradabilidade no solo, avaliada pelo método respirométrico. Desse modo, evidencia-se que, dentre os organismos testados, o mais sensível à exposição de ivermectina é o *Enchytraeus crypticus* e que, conforme abordado no decorrer deste trabalho, trata-se de um composto que, após ingestão e liberação em solo, apresenta alterações negativas quanto à qualidade deste.

Palavras-chave: toxicologia ambiental; ivermectina; poluição do solo.

Abstract

The growing demand for resources from livestock has driven the search for technologies and methods to improve the quality of life of animals raised in this activity, such as the use of veterinary drugs to prevent and reduce the risk of diseases and infections. In Brazil, ivermectin is one of these widely used drugs and animals excrete this substance along with feces, which can affect the soil biota where it is deposited. In order to evaluate the toxicity of ivermectin, this project consisted of conducting toxicity tests in tropical artificial soil, using the commercial injectable drug produced by the company Merial Saúde Animal LTDA, containing ivermectin at 1%. For the evaluation of toxicity in mesofauna, the test organism *Enchytraeus crypticus* was used, which plays a fundamental role in the decomposition of soil organic matter, widely used in ecotoxicology studies due to its sensitivity to environmental changes. To evaluate the phytotoxicity of the compost, seeds of *Eruca sativa* (arugula), of the Antonella variety and *Lactuca sativa* (lettuce) of the Lisa variety, purchased from the ISLA® company, commonly evaluated in toxicity tests of chemical compounds for reflecting the response of plants to adverse conditions, were used, evaluating the length and number of germinated seeds. To evaluate the effects on the soil microbial community, the respirometric method of Bartha and Pramer was applied, which evaluates the microbial activity of the soil, through the process of respiration of microorganisms, by the generation of CO₂ in soils exposed to different concentrations of chemical substances. With the results obtained in the tests applied in this study, it was noted that Ivermectin causes serious adverse effects on the edaphic fauna, but without significant effects on the germination of the seeds analyzed and presented slow biodegradability in the soil, evaluated by the respirometric method. Thus, it is evident that, among the organisms tested, the most sensitive to ivermectin exposure is *Enchytraeus crypticus* and that, as discussed throughout this work, it is a compound that, after ingestion and release into the soil, presents negative changes in its quality.

Keywords: environmental toxicology; ivermectin; soil pollution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura 2D da Ivermectina.....	14
Figura 2: <i>Enchytraeus crypticus</i> em meio de cultivo e aspecto geral	16
Figura 3: Esquema respirômetros de Bartha e Pramer	18
Figura 4: Desvio padrão e média de reprodução de <i>Enchytraeus crypticus</i>	29
Figura 5: Percentual de reprodução e de inibição.....	30
Figura 6: Geração acumulada de dióxido de carbono (mg CO ₂) após 25 dias.....	32
Figura 7: Média de germinação de sementes de rúcula x alface.....	35
Figura 8: Comprimento médio das sementes de rúcula x alface.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características da Ivermectina.....	13
Tabela 2: Características físico-químicas do solo natural tropical coletado e utilizado nos ensaios de respirometria de Bartha e Pramer.....	21
Tabela 3: Concentrações do fármaco ivermectina utilizada nos teste de toxicidade com o organismo <i>E. crypticus</i>	23
Tabela 4: Concentrações utilizadas no ensaio de respirometria de Bartha e Pramer para avaliação da biodegradação da ivermectina no solo natural.....	26
Tabela 5: Concentrações testadas no teste de fitotoxicidade com as sementes de alface e rúcula.....	28
Tabela 6: Normalidade Lilliefors L.....	31
Tabela 7: Quantificação de bactérias heterotróficas e fungos do solo (UFC/g _{solo}), antes do ensaio de respirometria de Bartha e Pramer.....	33
Tabela 7: Quantificação de bactérias heterotróficas e fungos do solo (UFC/g _{solo}), avaliados após 25 dias do ensaio de respirometria de Bartha e Pramer.....	33

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

CO ₂	Dióxido de Carbono
H ₂ O	Água
mm	Milímetro
L	Litro
Kg	Quilograma
µL	Microlitro
g	Gramma
KOH	Hidróxido de Potássio
mL	Mililitro
HCl	Ácido Clorídrico
±	Mais ou Menos
°C	Graus Celsius
mg	Miligramma
BOD	Estufa de demanda Bioquímica de Oxigênio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
KCl	Cloreto de Potássio
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de Cálcio
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
SAT	Solo Artificial Tropical
pH	Potencial Hidrogeniônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivos gerais.....	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	12
3.1 Agropecuária e o uso de fármaco veterinário no Brasil.....	12
3.2 Qualidade do solo e contaminação.....	14
3.3 Avaliação da qualidade do solo.....	16
3.3.1 Avaliação ecotoxicológica com organismos da mesofauna.....	16
3.4.2 Avaliação da atividade microbiana do solo.....	17
3.3.3 Avaliação da fitotoxicidade na germinação de sementes.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 Materiais.....	20
4.1.1 Equipamentos, vidrarias e reagentes.....	20
4.1.2 Organismo teste - <i>Enchytraeus crypticus</i>	20
4.1.3 Substância teste - Ivermectina.....	20
4.1.4 Amostra de Solo.....	20
4.1.5 Respirometria de Bartha e Pramer.....	21
4.1.5.1 Aditivo Biológico.....	22
4.1.6 Sementes.....	22
4.1.7 Análise de resultados.....	22
4.2 Métodos.....	22
4.2.1 Avaliação ecotoxicológica com <i>Enchytraeus crypticus</i>	22
4.2.1.1 Preparo de meio de cultivo.....	22
4.2.1.2 Cultivo de <i>Enchytraeus crypticus</i>	23
4.2.1.3 Teste de toxicidade crônica com <i>E. crypticus</i> em solo SAT.....	23
4.2.2 Método respirométrico Bartha e Pramer.....	24
4.2.2.1 Reagentes e soluções.....	24
4.2.2.2 Amostragem e preparação do solo.....	25
4.2.2.3 Método respirométrico de Bartha e Pramer.....	25
4.2.2.4 Quantificação de fungos e bactérias heterotróficas.....	27
4.2.3 Teste com sementes de <i>Eruca sativa</i> e <i>Lactuca sativa</i>	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1 Resultados da avaliação ecotoxicológica com <i>Enchytraeus crypticus</i>	29
5.2 Resultados do ensaio de respirométrico de Bartha e Pramer.....	31
5.2.1 Resultados da quantificação de bactérias heterotróficas e fungos.....	33
5.3 Resultados dos ensaios de fitotoxicidade com sementes.....	34
6 CONCLUSÕES.....	35
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
8 APÊNDICES.....	43

1 INTRODUÇÃO

A intensificação da produção de alimentos nas últimas décadas tem impulsionado o uso crescente de tecnologias e métodos para o tratamento de animais de criação, visando minimizar os riscos e sintomas de doenças e infecções. Entre os tratamentos veterinários mais utilizados encontra-se a aplicação de fármacos de prevenção, como a ivermectina, no controle e tratamento de parasitas em bovinos, suínos, ovinos e equinos (LOVADOURO *et al.*, 2013).

A ivermectina é uma substância classificada como altamente tóxica (classe III) e degradação no solo com meia-vida (DT50) de 112 dias, podendo variar de 7 a 240 dias. Além disso, apresenta alta mobilidade no solo, com um coeficiente de adsorção (Koc) de 14.150 (VSDB, 2021). Essas características indicam que o uso da ivermectina no tratamento veterinário pode representar um desafio considerando a possibilidade de atingir o solo, uma vez que é excretada junto com as fezes dos animais, além de ser um composto químico de difícil degradação (MOLENTO, 2021).

O solo desempenha um papel fundamental como habitat para uma variedade de organismos, tornando-se crucial a realização de análises de toxicidade para avaliar os possíveis efeitos que substâncias como a ivermectina podem exercer sobre esses organismos. A interação entre os organismos e o solo está diretamente relacionada à capacidade produtiva do mesmo (NOVAIS *et al.*, 2014).

Desta forma, fica evidente a importância da avaliação dos impactos que a ivermectina pode produzir para a biota no solo, por meio de métodos aplicáveis a fim de verificar a toxicidade da ivermectina no solo, para microrganismos, mesofauna e plantas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto do fármaco de uso veterinário Ivermectina, na sua formulação comercial Ivomec® 1% injetável em organismos do solo.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade do fármaco veterinário ivermectina no solo artificial tropical (SAT), utilizando o organismo *Enchytraeus crypticus*;

- Avaliar a atividade microbiana do solo quando contaminado com a ivermectina mediante ensaios de respirometria de Bartha e Pramer e;
- Avaliar a fitotoxicidade do fármaco de uso veterinário ivermectina nas germinação de sementes de *Eruca sativa* e *Lactuca sativa*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Agropecuária e o uso de fármaco veterinário no Brasil

O Brasil é amplamente reconhecido como um dos protagonistas globais na produção de proteína animal, isso porque o país possui extenso território, recursos naturais favoráveis e um setor agropecuário robusto. Esses atributos contribuem para o desenvolvimento e crescimento da indústria de carne, sendo a bovina a mais proeminente na produção brasileira. Os estados de maior atuação neste setor são os estados do Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Pará, com o sistema predominante de pastagens (ABIEC, 2023).

No contexto internacional, o Brasil é um importante exportador de carne, exportando cerca de 191 mil toneladas (R\$ 952 Mi) só em maio de 2023, tendo como principal destinação a China (58,8%), além de outros países como Estados Unidos, União Europeia, Rússia e países árabes (ABIEC, 2023). Considerando a alta exportação de carne bovina no Brasil, a aplicação de métodos para preservação da qualidade do produto deve ser igualmente proporcional, desse modo, a manutenção da saúde e do bem-estar dos animais é um aspecto crucial para garantir o crescimento contínuo e sustentável desse setor, sendo que os medicamentos veterinários, especialmente os antiparasitários, desempenham um papel de extrema importância nesse contexto. Nessa perspectiva, a indústria farmacêutica desempenha um papel significativo na produção de parasiticidas, e um dos compostos amplamente utilizados pertencem à família das avermectinas, a qual engloba substâncias como a ivermectina, abamectina, doramectina e eprinomectina (FERREIRA *et al.*, 2019).

As avermectinas têm sido amplamente utilizadas na medicina veterinária, tanto na pecuária quanto em outras áreas relacionadas à saúde animal, devido às suas propriedades antiparasitárias. No entanto, é fundamental investigar os potenciais efeitos dessas substâncias nos ecossistemas em que são utilizadas. As

evidências disponíveis até o momento indicam que a ivermectina pode exercer efeitos negativos e até mesmo letais em diversos invertebrados terrestres, especialmente aqueles que habitam a camada superficial do solo (VOKRAL *et al.*, 2019).

A ivermectina, assim como os antibióticos, têm sido amplamente investigada em estudos de ecotoxicologia veterinária devido à sua persistência, toxicidade e ampla presença no meio ambiente. Essa substância tem sido objeto de estudos científicos devido à necessidade de compreender melhor seus efeitos e impactos nos ecossistemas, abordando a ecotoxicologia da ivermectina e buscando investigar seus efeitos e distribuição no ambiente. Esses estudos fornecem uma base científica sólida para a avaliação e mitigação dos possíveis impactos na fauna e flora aquáticas e terrestres (VOKRAL *et al.*, 2019).

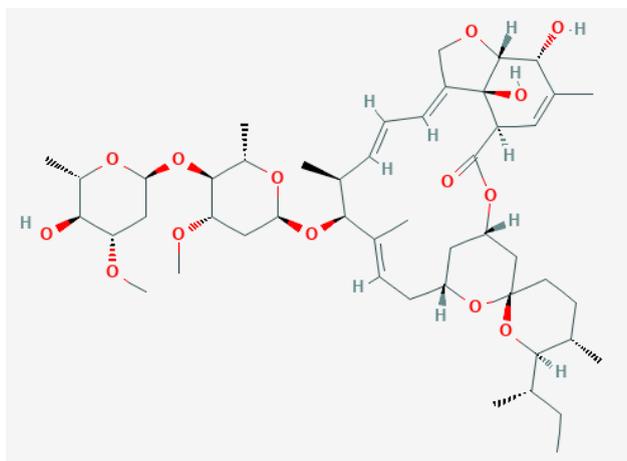
A ivermectina é parcialmente metabolizada no organismo e sua principal via de eliminação ocorre por meio das fezes, independentemente da espécie animal e do método de administração. Conseqüentemente, uma quantidade significativa do fármaco ativo original pode ser encontrada nas fezes dos animais tratados (POPOVA *et al.*, 2013 *apud* VOKRAL *et al.*, 2009).

Da família das avermectinas a ivermectina é um dos fármacos mais comercializados, com características expressas na Tabela 1 (SINDAN, 2020) e Figura 1.

Tabela 1: Características da Ivermectina

Fórmula Molecular	C ₄₈ H ₇₄ O ₁₄
Peso molecular	875,1
CAS number	70288-86-7
EC number	274-536-0
Solubilidade	Insolúvel

Fonte: Molbase (2021); PubChem (2021); Sigmaaldrich (2021).

Figura 1: Estrutura 2D da Ivermectina

Fonte: PubChem (2021).

A liberação da ivermectina no ambiente ocorre devido a diferentes mecanismos, tais como a liberação direta de animais em pastagens por meio de fezes e urina e na aplicação intencional de esterco e chorume em terras agrícolas. Em contato com o solo, a ivermectina apresenta alta toxicidade mesmo em doses baixas, sendo caracterizada por sua afinidade lipofílica. Resultando em forte interação com o solo, intensificando a preocupação quanto aos efeitos que esse composto pode exercer sobre microrganismos (JENSEN *et al.*, 2003).

Neste cenário, a avaliação dos efeitos toxicológicos para o solo tem sido tema de diversos estudos acadêmicos, aplicando uma vasta quantidade de testes laboratoriais a fim de identificar quais são os cenários em que fármacos veterinários e outros compostos de origem antrópica podem ser prejudiciais para a qualidade do solo e a permanência de organismos que vivem nele.

3.2 Qualidade do solo e contaminação

Segundo Ferreira *et al.* (2019), a qualidade do solo refere-se à capacidade do mesmo em desempenhar as funções essenciais de forma sustentável, além de atuar como um indicador de saúde e produtividade, bem como da capacidade de fornecer serviços ecossistêmicos vitais, tais como i) ciclagem de nutrientes, que é a capacidade de retenção e disponibilização de nutrientes para as plantas; ii) biodiversidade, pois abrigam uma variedade de organismos, os quais são vitais na decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e melhoria da estrutura do solo e; iii) segurança alimentar e saúde humana, pois a maior parte da produção

de alimento depende do solo em determinada fase do processo, como a agricultura na produção de vegetais e na agropecuária para o alimentação de animais de criação para produção de carne.

Avaliar a qualidade do solo é essencial para o manejo sustentável e a preservação dos recursos naturais. Além disso, solos contaminados por metais, resíduos químicos, patógenos e outros compostos tóxicos, podem representar riscos quanto a efetivação dos serviços ecossistêmicos, tanto para a saúde dos organismos decompositores de matéria orgânica quanto para a produção de alimentos e para a saúde dos consumidores (FERREIRA, 2019).

Segundo SOUZA & SIQUEIRA (2006), a contaminação do solo ocorre quando substâncias nocivas são introduzidas no solo, resultando em um ambiente adverso para os organismos vivos e afetando a qualidade e a saúde do mesmo. A contaminação pode ter origem natural, como depósitos minerais ou atividades vulcânicas, mas é frequentemente causada por atividades humanas, tais como i) atividades industriais, com emissões atmosféricas, descarte inadequado de resíduos industriais, vazamentos de produtos químicos e operações de mineração, que resultam na contaminação do solo com metais pesados, substâncias químicas tóxicas e poluentes orgânicos voláteis persistentes; ii) agricultura, com o uso intensivo de fertilizantes, pesticidas e herbicidas, que pode levar à contaminação do solo por resíduos químicos; iii) vazamentos de combustíveis, provenientes de tanques de armazenamento de combustíveis ou acidentes envolvendo derramamentos de petróleo, causando contaminação do solo com hidrocarbonetos, que são tóxicos para os organismos do solo e; iv) atividades domésticas, com o descarte inadequado de resíduos sólidos, esgoto e produtos químicos domésticos, como óleos usados, produtos de limpeza e tintas, podem contaminar o solo nas áreas residenciais.

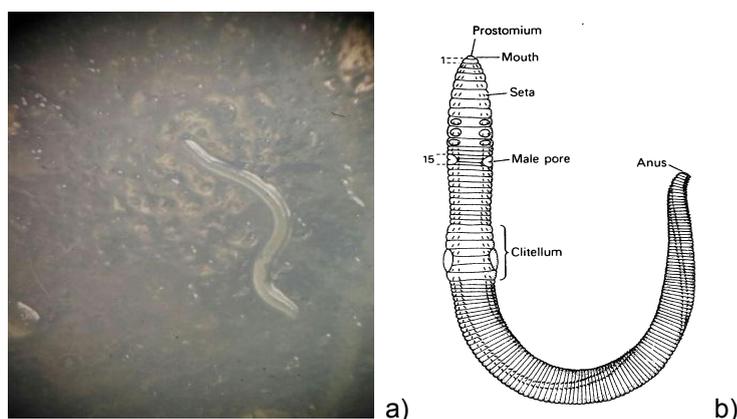
A contaminação do solo pode ter impactos significativos no meio ambiente e na saúde humana. Pode afetar a qualidade da água subterrânea, uma vez que substâncias contaminantes podem lixiviar e atingir os lençóis freáticos. Além disso, os poluentes do solo podem ser absorvidos pelas plantas e entrar na cadeia alimentar, representando riscos para a saúde humana, bem como a de outros animais (SILVEIRA e FREITAS, 2007).

3.3 Avaliação da qualidade do solo

3.3.1 Avaliação ecotoxicológica com organismos da mesofauna

O organismo indicador *Enchytraeus crypticus*, pertencente à mesofauna do solo, um anelídeo terrestre da classe Oligochaeta e da família Enchytraeidae que desempenha um papel importante na decomposição da matéria orgânica do solo (DIDDEN *et al.*, 1993). Esses organismos são incolores, possuem pele lisa e úmida, com tamanho variando de 2 a 40 mm (Figura 2), e apresentam um cinturão glandular em forma de anel branco chamado clitelo (clitellum). Embora sejam encontrados principalmente em ambientes florestais, também são encontrados em outras regiões temperadas do mundo, exercendo influência na estrutura do solo e desempenhando um papel essencial na cadeia alimentar (RÖMBKE *et al.*, 2017), sendo responsáveis por regular a decomposição da matéria orgânica do solo, mesmo que indiretamente (NIVA *et al.*, 2010). Por viverem em contato direto com a fração porosa do solo, esses organismos estão constantemente expostos a possíveis contaminantes presentes no ambiente, seja por contato dérmico, ingestão ou inalação (CASTRO-FERREIRA *et al.*, 2012).

Figura 2: *Enchytraeus crypticus*: em meio de cultivo e aspecto geral



Fonte: GRANZOTO, 2018 (a) e NEMAPLEX, 2018 (b)

Nesse contexto, o *Enchytraeus crypticus* é uma espécie comumente utilizada em ensaios ecotoxicológicos do solo como organismo-teste para avaliar a sobrevivência, reprodução, bioacumulação e características comportamentais, como evasão, embriotoxicidade, eclosão, crescimento e estado de maturidade (GONÇALVES *et al.*, 2016). O organismo tem sido utilizado para avaliação de

efeitos de compostos de origem antrópica que podem causar efeitos adversos a esses organismos, tais como metais, agrotóxicos, fármacos de uso humano e veterinário, lodo de esgoto doméstico e industrial, entre outros (KOLAR *et al.*, 2008; TUERLINCKX *et al.*, 2015; ZORTÉA *et al.*, 2017; JIN *et al.*, 2023).

Um estudo realizado por JENSEN *et al.* (2003), que aplicaram fármacos veterinários antibacterianos e antiparasitários, avaliando os efeitos adversos em organismos não-alvo presentes no solo (colêmbolos e enquitreídeos), constatou que esses compostos não apresentaram efeitos tóxicos a ponto de causar letalidade para os organismos adultos testados, mas causaram inibição na reprodução quando expostos a concentrações maiores do que as encontradas em solo.

No entanto, a ivermectina apresentou-se como composto mais tóxico para os organismos testados, sugerindo um potencial risco para espécies não-alvo que habitam o ambiente, enquanto os agentes antibacterianos não apresentam um efeito tóxico direto em concentrações ambientais realistas, embora possam causar efeitos indiretos na cadeia alimentar.

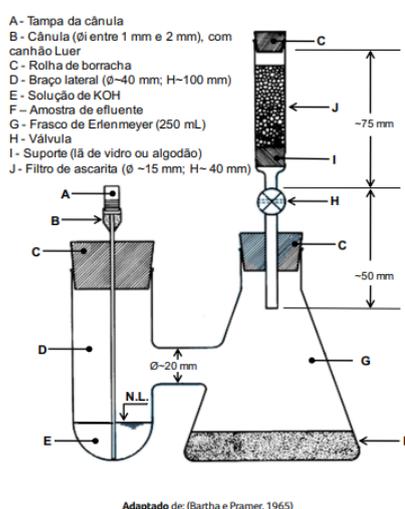
3.4.2 Avaliação da atividade microbiana do solo

A degradabilidade de um composto diz respeito ao grau de persistência, ou seja, ao tempo em que o mesmo mantém sua estrutura original, mesmo após sua aplicação para o fim pelo qual foi produzido, ou alterada mas ainda atuando como contaminante de efeito residual no meio em que foi depositado e apresentando riscos à biota receptora, tais como imobilidade, inibição de reprodução ou até mesmo letalidade. Os microrganismos heterotróficos (fungos e bactérias) são, geralmente, os responsáveis pelo processo de biodegradação, convertendo substâncias químicas em compostos metabólitos não tóxicos, como CO₂ e H₂O (MONTAGNOLLI, 2009).

A atividade microbiana do solo pode ser avaliada quantificando-se o metabolismo aeróbio e anaeróbio da matéria orgânica disposta no mesmo. Pode-se determinar a taxa de transformação de substâncias químicas orgânicas, bem como compreender a formação e degradação dos produtos resultantes aos quais as plantas e organismos do solo podem estar expostos. Essa avaliação é necessária para produtos químicos que são aplicados diretamente no solo ou que possivelmente afetam o ambiente do solo (OECD, 2002).

O método de respirometria é utilizado para avaliar a biodegradação de resíduos no solo, onde amostras de resíduos ou substâncias químicas são incubadas em respirômetros de Bartha e Pramer (Figura 3), sob condições controladas de laboratório, como temperatura e umidade constantes. Após intervalos de tempo apropriados, as amostras de solo são extraídas e analisadas quanto à substância original e aos produtos resultantes da transformação. Neste ensaio, as taxas de mineralização da substância testada podem ser determinadas, quantificando-se o CO₂ liberado no processo de respiração e capturado em solução de KOH depositada no respirômetro (SOLDERA *et al.* 2020).

Figura 3: Esquema respirômetros de Bartha e Pramer



Adaptado de: (Bartha e Pramer, 1965)

Fonte: SOLDERA *et al.*, 2020.

A respirometria de Bartha e Pramer é um teste que avalia a biodegradabilidade imediata, ou seja, em 28 dias uma substância química deve ter sua estrutura oxidada entre 60 a 80% pelos microrganismos presentes no solo. Indicando a facilidade com o qual um composto é degradado pela atividade microbiana sob condições similares às encontradas no ambiente (OECD, 2002).

Pode-se ainda adicionar aditivos biológicos ao teste de respirometria de Bartha e Pramer, em ensaios onde nota-se reduzida atividade microbiana, neste caso espera-se que ocorra aumento na taxa de respiração microbiana, indicando maior atividade biológica e degradação dos compostos orgânicos presentes no meio. Esses aditivos biológicos são compostos que contêm microrganismos benéficos (bactérias, fungos ou enzimas) e podem acelerar a decomposição de

materiais orgânicos complexos, podendo ser úteis em casos em que a atividade microbiana natural no solo é limitada, como em solos contaminados por substâncias tóxicas ou em solos degradados (TYAGI *et al.*, 2011).

TYAGI *et al.* (2011) apresentam revisão abrangente sobre a eficácia, limitações e comparação entre os processos do uso de aditivos biológicos em técnicas de bioaugmentação e bioestimulação e discute estudos experimentais realizados em sistemas controlados e casos reais de campo para avaliar a aplicação dessas técnicas, tais como o de LI *et al.* (2009), que constataram que um aditivo composto por cinco fungos (*Phanerochaete chrysosporium*, *Cunninghamella* sp., *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus niger*) e três bactérias (*Bacillus* sp., *Zoogloea* sp. e *Flavobacterium*) aumentou a taxa de degradação significativamente (41,3%) de PAH em solo contaminado; e o de ALISI *et al.* (2009), que constataram a degradação completa de óleo diesel e fenantreno, 60% da degradação de isoprenóides; e cerca 75% da degradação dos hidrocarbonetos totais em 42 dias, com uso aditivo biológico.

MAZZEO *et al.* (2020) avaliaram os efeitos da bioestimulação na biodegradação de lodo de esgoto aeróbio e anaeróbio em três diferentes composições de solo em teste respirométrico de Bartha e Pramer, e relacionaram o aumento na produção de CO₂ com a adição de borra de café e bagaço de cana-de-açúcar como bioestimulantes.

3.3.3 Avaliação da fitotoxicidade na germinação de sementes

A alface (*Lactuca sativa* L.) e a rúcula (*Eruca sativa* Mill.) são amplamente consumidas em várias regiões do mundo e são conhecidas por sua composição nutricional, rica em nutrientes e fitonutrientes. Essas hortaliças são fontes importantes de ferro, potássio, vitaminas A, C, E, folato, entre outras. Essa composição nutricional torna tanto a alface quanto a rúcula promissoras na produção de alimentos funcionais, com potencial para promover a saúde humana (Dall'Acqua *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2016; *apud* SANTIAGO *et al.*, 2020).

Rúcula e alface são espécies amplamente utilizadas em testes de fitotoxicidade com metais, e compostos químicos, por serem sensíveis a efeitos adversos (SANTIAGO *et al.*, 2020), como o de SOUZA *et al.* (2022) com a avaliação de efeitos do fármaco veterinário eprinomectina em teste de germinação com

sementes de *Allium cepa*, que também apresentaram efeitos negativos quando expostas a elevadas concentrações da substância-teste.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Equipamentos, vidrarias e reagentes

Os equipamentos, vidrarias e reagentes utilizados no desenvolvimento desta pesquisa foram os disponíveis no Laboratório de Ecotoxicologia do Solo (LAECOS) e no Laboratório de Microbiologia (LAMIC) da FT – UNICAMP.

4.1.2 Organismo teste - *Enchytraeus crypticus*

O organismo teste utilizado é o *Enchytraeus crypticus* da classe Oligochaeta, família Enchytraeidae, cultivado no Laboratório de Ecotoxicologia dos Solos (LAECOS) localizado na Faculdade de Tecnologia da UNICAMP (FT/UNICAMP)

4.1.3 Substância teste - Ivermectina

O fármaco de nome comercial Ivomec utilizado para a contaminação do solo foi à base de Ivermectina a 1%, da Merial Saúde Animal LTDA., adquirido comercialmente. Este fármaco está registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob nº 1275 em 16/12/80, e apresenta em sua composição a cada 100 mL, 1,0 g de Ivermectina. O fármaco adquirido comercialmente é utilizado para combater parasitas internos e externos que afetam a produtividade e a saúde de suínos, ovinos e bovinos.

4.1.4 Amostra de Solo

Seguindo o protocolo da norma ABNT – NBR 15537 (2014) foi utilizado para o teste de toxicidade dos *E. crypticus*, Solo Artificial Tropical (SAT), uma adaptação do solo artificial, preparado em laboratório constituído pela mistura de 72,5% de areia industrial (fina), 22,5% de caulim, e 5% de fibra de casca de coco.

Para os ensaios de respirometria de Bartha e Pramer, coletou-se solo natural (Tabela 2) no dia 28 de março de 2023, em área não antropizada no campus da Universidade de São Paulo (USP), no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA), situado a cerca de 25 km do campus 1 da USP São Carlos,

junto à Represa do Lobo (Broa), pela equipe do Laboratório de Estudos Avançados em Microbiologia (LEMA) da Faculdade de Tecnologia da UNICAMP - Limeira/SP.

Tabela 2: Características físico-químicas do solo natural tropical coletado e utilizado nos ensaios de respirometria de Bartha e Pramer

Parâmetros	Resultados	Unidade
Matéria Orgânica	29	g.dm ⁻³
pH (CaCl ₂)	4,8	
Hidrogênio + alumínio	28	mmolc.dm ⁻³
Fósforo (P)	5	g.dm ⁻³
Potássio (K)	0,5	mmolc.dm ⁻³
Cálcio (Ca)	26	mmolc.dm ⁻³
Magnésio (Mg)	6	mmolc.dm ⁻³
Soma de bases	32,5	mmolc.dm ⁻³
Saturação de bases	54	%
CTC	60,5	mmolc.dm ⁻³
Saturação de bases	54	%
Boro (B)	0,39	mg.dm ⁻³
Cobre (Cu)	4,3	mg.dm ⁻³
Ferro (Fe)	22	mg.dm ⁻³
Manganês (Mn)	21,7	mg.dm ⁻³
Zinco (Zn)	1	mg.dm ⁻³

CTC = capacidade de troca catiônica

Fonte: IAC, 2023.

4.1.5 Respirometria de Bartha e Pramer

A biodegradação da ivermectina foi analisada mediante o método de respirometria de Bartha e Pramer, de acordo com OECD (2002), e incubados durante o período de 25 dias em estufa BOD a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, sendo avaliada a geração de CO₂ acumulado durante o processo.

4.1.5.1 Aditivo Biológico

O aditivo biológico, denominado Microgeo foi fornecido pela empresa Microbiol Indústria e Comércio LTDA, localizada no município de Limeira - SP, sendo composto por 5% de produto orgânico comercial (sólido-Microgeo®), 20% de esterco bovino e água. Este composto é um meio de cultura (probiótico) que alimenta os microrganismos do rúmen bovino em compostagem líquida. (D'ANDREA, 2010).

O Microgeo é em média por 300 grupos de microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras e apresenta até 89% de bactérias, com 10^7 a 10^9 células de microrganismos/mL (MICROGEO BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA, 2022).

4.1.6 Sementes

Sementes de *Eruca sativa* (rúcula), da variedade Antonella e *Lactuca sativa* (alface) variedade Lisa foram adquiridas na empresa ISLA®, ambas livres de agroquímicos, com germinação superior a 95%.

4.1.7 Análise de resultados

Os resultados foram aplicados em análise estatística no software Paleontological Statistical 4.03 (Past4), com teste de ANOVA, teste de Tukey, teste de distribuição da normalidade segundo Lilliefors L, e determinação de desvio padrão e standard error com o teste univariate statistics.

4.2 Métodos

4.2.1 Avaliação ecotoxicológica com *Enchytraeus crypticus*

4.2.1.1 Preparo de meio de cultivo

Para o preparo de 100 mL da solução a ser utilizada como meio de cultivo, transferiu-se 96,5 mL de água ultrapura para um frasco de vidro de 250 mL, e em seguida acrescentou-se 1,7 mg de ágar bacteriológico, e acrescentou-se 0,75 mL de NaHCO_3 e 0,8 mL de KCL. Homogeneizou-se a solução e seguiu-se com o frasco para um agitador magnético com aquecimento, a 250°C , até que a solução apresentasse coloração translúcida. Na sequência, levou-se o frasco para autoclave a 120°C durante 30 minutos e, ao término deste, deixou-se o frasco em bancada resfriando até atingir 60°C .

Após, acrescentou-se 1 mL da solução $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 1 mL de MgSO_4 , homogeneizou-se, despejou-se a solução em placas de petri e esperou-se até solidificar e, por fim, armazenou-se as placas embalada em papel alumínio e armazenada sob refrigeração de 4°C até o momento de uso, sendo realizada a transferência de meio de acordo com a necessidade.

4.2.1.2 Cultivo de *Enchytraeus crypticus*

Seguindo a norma ABNT/NBR 16387 (2012) o cultivo dos *Enchytraeus crypticus* foi realizado em placas de Petri com ágar nutritivo de acordo com a descrição no item 4.2.1.1.

Os organismos foram mantidos em estufa de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16h/8h (claro/escuro) e alimentados 2 vezes na semana com farinha de aveia, e a umidade do meio corrigida com água destilada. A cada três meses foi necessário transferir os organismos para novo meio de cultivo, visando renovar a cultura e consequentemente garantir que a espécie sobreviva.

4.2.1.3 Teste de toxicidade crônica com *E. crypticus* em solo SAT

Avaliou-se o fármaco Ivermectina injetável de uso veterinário, de nome comercial IVOMEK, o qual possui uma concentração 1%, ou seja, 10 mg de ivermectina a cada 10000 mL. As concentrações do contaminante (Tabela 3) foram determinadas de acordo com JENSEN *et al.* (2009), dando-se preferência para os valores múltiplos de 2, a fim de cumprir com os requisitos para o cálculo do CE50.

Tabela 3: Concentrações do fármaco ivermectina utilizada nos teste de toxicidade com o organismos *E.crypticus*

Identificação	Concentração (mg/kg _{solo})
Controle (Ctrl)	0
C1	0,2
C2	0,4
C3	1,6
C4	3,2
C5	6,4

Fonte: Autoria própria.

O solo artificial tropical (SAT) foi preparado, pesando-se, 150 g de areia, 10 g de fibra de coco e 40 g de caulim. Realizou-se este procedimento para cada concentração-teste e controle, armazenando-os em sacos plásticos identificados.

Realizou-se a contaminação do SAT, aplicando-se, em cada saco plástico identificado, o volume de ivermectina correspondente a cada concentração-teste, como apresentado na Tabela 3, completando com água destilada, a fim de atender ao volume de 30 mL correspondente a 20% de umidade do solo, sendo que para a concentração controle, adicionou-se 30 mL de água destilada. A fim de estabilizar o contaminante, os solos preparados ficaram em repouso durante 2 dias.

O teste consistiu na exposição de 10 indivíduos adultos (clitelados) em 30 g de solo contaminado como o fármaco ivermectina de acordo com ISO 16.387 (2014). O teste foi realizado em 5 repetições para cada concentração utilizada, e 6 repetições para o controle, em recipientes de vidro. O teste permaneceu durante o período de 21 dias a temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12/12h (luz/escuro), com intensidade luminosa de 400-800 lux. Os organismos foram alimentados a cada 7 dias com farinha de aveia e correção de umidade com água destilada.

Mediu-se o pH ao início e ao final do teste, e não apresentou variações significativas nos valores obtidos nas leituras, ou seja, o pH manteve-se estável ao longo do teste.

O teste foi finalizado inserindo-se 1 mL de rosa de bengala (1%) e 20 mL de álcool 70%, agitando-se cada frasco, os quais, posteriormente, permaneceram em repouso durante 3 dias.

Para a quantificação dos organismos, o solo foi lavado em peneira e transferido para bandejas brancas, realizando-se a contagem manual dos mesmos, com iluminação para facilitar a identificação dos organismos. Os resultados foram aplicados no software PAST para análise estatística e cálculo do CE50.

4.2.2 Método respirométrico Bartha e Pramer

4.2.2.1 Reagentes e soluções

Para a preparação de água isenta de CO_2 , inicialmente, transferiu-se 2 litros de água destilada para um béquer 2L, inseriu-se uma barra magnética e seguiu-se para fervura em chapa de agitação magnética com aquecimento durante 30 minutos

em agitação, seguidos de 10 minutos em bancada para resfriamento. Após, transferiu-se para um galão com filtro de ascarita.

Para a preparação da solução de KOH, que é responsável pela captura do CO₂ gerado no processo de biodegradação nos respirômetros, pesou-se 11,2 g de hidróxido de potássio (KOH) 0,2 N e dissolveu-se em água isenta de CO₂. Após, transferiu-se para um recipiente com filtro de ascarita. Padronizou-se a solução titulando com 100 mL da solução ftalato ácido de potássio e duas gotas de vermelho de metila até a solução atingir coloração alaranjada e anotou-se o volume consumido.

Após, utilizando pipeta volumétrica, adicionou-se 17 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado p.a. para um balão volumétrico 2L, completou-se o volume com água destilada e agitou-se para homogeneizar. Por fim, transferiu-se para um recipiente de titulação, e padronizou-se a solução titulando com 100 mL de carbonato de sódio 0,1 N, disponível no laboratório, e duas gotas de vermelho-de-metila até a solução atingir coloração alaranjada e anotou-se o volume consumido.

4.2.2.2 Amostragem e preparação do solo

Para a verificação da umidade do solo, inicialmente, separou-se cerca de 1 Kg de solo, peneirou-se em peneira de malha 2 mm e transferiu-se cerca de 70 mg da amostra de solo para duas cápsulas de incineração de peso conhecido, pesou-se em balança analítica e anotou-se os valores. Na sequência, levou-se as cápsulas de incineração contendo solo úmido para estufa, na qual permaneceram por 24 horas a $120 \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente, pesou-se ambas as cápsulas e anotou-se os resultados e, uma vez identificado o percentual de umidade residual, deu-se início ao preparo do teste.

4.2.2.3 Método respirométrico de Bartha e Pramer

O ensaio que avalia a biodegradação de resíduos no solo teve início em 11 de abril de 2023, para o qual utilizou-se as concentrações expressas na Tabela 4, em triplicata. As concentrações foram as mesmas utilizadas em teste de ecotoxicidade e serão descritas a seguir.

Aos respirômetros adicionou-se 50 g do solo com umidade residual conhecida e utilizando-se pipeta automática adicionou-se os volumes de ivermectina

necessários para cada concentração e 16 mL de água destilada, a fim de adequar a umidade residual do solo latossolo vermelho de 7% com a capacidade de campo de 15%, sendo que para as taxas às quais adicionou-se 1 mL de aditivo biológico, o volume de água destilada foi de 15 mL, apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Concentrações utilizadas no ensaio de respirometria de Bartha e Pramer para avaliação da biodegradação da ivermectina no solo natural

Respirômetros	Concentração (mg/kg solo úmido)	Aditivo biológico (mL)	Água destilada (mL)
Controle 1 (C1)	0	0	16
Controle 2 (C2)	0	1	15
Taxa 1 (T1)	0,2	0	16
Taxa 2 (T2)	0,2	1	15
Taxa 3 (T3)	10	0	16
Taxa 4 (T4)	10	1	15

Fonte: Autoria própria

Após solo disposto no respirômetro, adicionou-se 10 mL de KOH no braço lateral do mesmo. Os respirômetros foram incubados em estufa BOD a $28 \pm 2^\circ \text{C}$, durante o período de 25 dias. Para a quantificação da geração de CO_2 , realizou-se a titulação do KOH periodicamente. O cálculo da massa de CO_2 produzida a cada titulação foi obtido de acordo com a Equação 1, adaptado da literatura (SOLDERA, 2022)

$$m\text{CO}_2 = [(A-B)) \times 50] \times (0,044) \times (f \text{ HCl}) \quad (1)$$

onde:

$m\text{CO}_2$ = massa de CO_2 emitido (mg);

A = Média dos volumes de HCl (mL) gastos na titulação dos brancos;

B = Média dos volumes de HCl (mL) gastos na titulação das amostras;

50 = Fator de conversão de neqCO_2 em nCO_2 , expressa em μmol ;

0,044 = Fator resultante da multiplicação de três outros fatores (10^{-6} = Fator de conversão para nCO_2 , de μmol para mol; $\text{MMCO}_2 = 44$, massa molar do CO_2 (g mol⁻¹) e 1000 = Fator de conversão de gramas para miligramas);

fHCl = Fator de correção da concentração real da solução de HCl.

4.2.2.4 Quantificação de fungos e bactérias heterotróficas

Simultaneamente ao teste de respirometria de Bartha e Pramer, realizou-se o plaqueamento de fungos e bactérias heterotróficas, utilizando a técnica de semeadura em placa *Pour Plate*, em meio Plate Counter Agar (PCA) para bactérias heterotróficas e meio Sabouraud para fungos, a fim de identificar o número de colônias de microrganismos presentes no solo no início e no final do ensaio de respirometria.

Inicialmente, preparou-se a diluição 10^{-1} (1:10), para tal, transferiu-se 10 g de solo úmido, para frasco contendo 90 L de água de diluição, previamente preparada com 1 mg de peptona em 1 L de água destilada, e agitou-se para homogeneizar. Após, transferiu-se 9 mL da primeira diluição (1:10) para um frasco contendo 10 mL de água de diluição, gerando a diluição 10^{-2} (1:100). Repetiu-se o procedimento até atingir a diluição de 10^{-12} .

Na sequência, pipetou-se 1 mL de cada diluição e placa de Petri, sendo que para cada diluição realizou-se o plaqueamento em triplicata. Após, adicionou-se os meios de cultivo, PCA nas placas contendo as diluições 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-12} , para o plaqueamento de bactérias heterotróficas, e meio Sabouraud nas placas contendo as diluições 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-7} , para o plaqueamento de fungos. A seleção das diluições para fungos e bactérias se deu por conta da baixa presença de fungos no solo, testando apenas as menores diluições ímpares para este.

Por fim, acondicionou-se as placas, devidamente identificadas, em estufa bacteriológica durante 48 horas a 35 ± 2 °C e, ao final do período, realizou-se a quantificação de colônias em contador de colônias, utilizando pincel marcador retroprojeter e contador manual.

O mesmo procedimento foi realizado ao final do teste de respirometria de Bartha e Pramer, sendo que para cada taxa, realizou-se o plaqueamento em duplicatas para cada diluição.

4.2.3 Teste com sementes de *Eruca sativa* e *Lactuca sativa*

O teste de fitotoxicidade com as sementes de *Eruca sativa* e *Lactuca sativa* teve início em 02 de maio de 2023, para o qual, inicialmente, preparou-se as soluções-estoque com volume de ivermectina correspondente para cada concentração (Tabela 5), selecionadas a partir das concentrações aplicadas no teste

ecotoxicológico com *Enchytraeus crypticus* e no método respirométrico de Bartha e Pramer, que tiveram como base o intervalo testado por Jensen *et al.* (2009).

Tabela 5: Concentrações testadas no teste de fitotoxicidade com as sementes de alface e rúcula

Solução-estoque - alface	Solução-estoque - rúcula	Concentração
Controle (Ctrl - alface)	Controle (Ctrl - rúcula)	(mg/L água destilada) 0
C1 - alface	C1 - rúcula	0,2
C2 - alface	C2 - rúcula	3,2
C3 - alface	C3 - rúcula	10

Fonte: Autoria própria

Para cada concentração, preparou-se o teste em triplicatas com sementes de rúcula e alface, separadamente. Para tal, adicionou-se um papel filtro com diâmetro de 90 mm em placa de petri e, utilizando uma pipeta automática, adicionou-se 4 mL de solução-estoque. Na sequência, utilizando uma pinça, adicionou-se 20 sementes em cada placa, distribuídas aleatoriamente, atendendo a identificação de espécie e concentração em cada placa.

Por fim, dispôs-se as placas em bandeja enrolada em saco plástico preto identificado, e acondicionou-se a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 dias. Ao final do período, realizou-se a medição de raízes de cada semente germinada e anotou-se os valores obtidos.

Realizou-se os cálculos a fim de determinar as variações acerca da germinação das sementes em relação às concentrações testadas, a partir da média entre as medidas, utilizando a equação (2) para o cálculo do comprimento médio, a equação (3) para o cálculo do percentual de variação do comprimento médio das raízes e a equação (4) para o cálculo do percentual de variação de germinação (ISO, 2012).

$$C_{\text{médio}} = C_{\text{total}}/SG \quad (2)$$

$$\% \text{variação de germinação} = \{[(C_{\text{médio}} - C_{\text{médio-contrôle}}) * 100]/C_{\text{médio-contrôle}}\} \quad (3)$$

$$\% \text{variação de germinação} = \left\{ \frac{(SG - SG_{\text{controle}}) * 100}{SG_{\text{controle}}} \right\} \quad (4)$$

Onde:

$C_{\text{médio}}$ = Comprimento médio das raízes germinadas;

C_{total} = Comprimento total das raízes germinadas.

SG = Sementes germinadas

SG_{controle} = Sementes germinadas no controle.

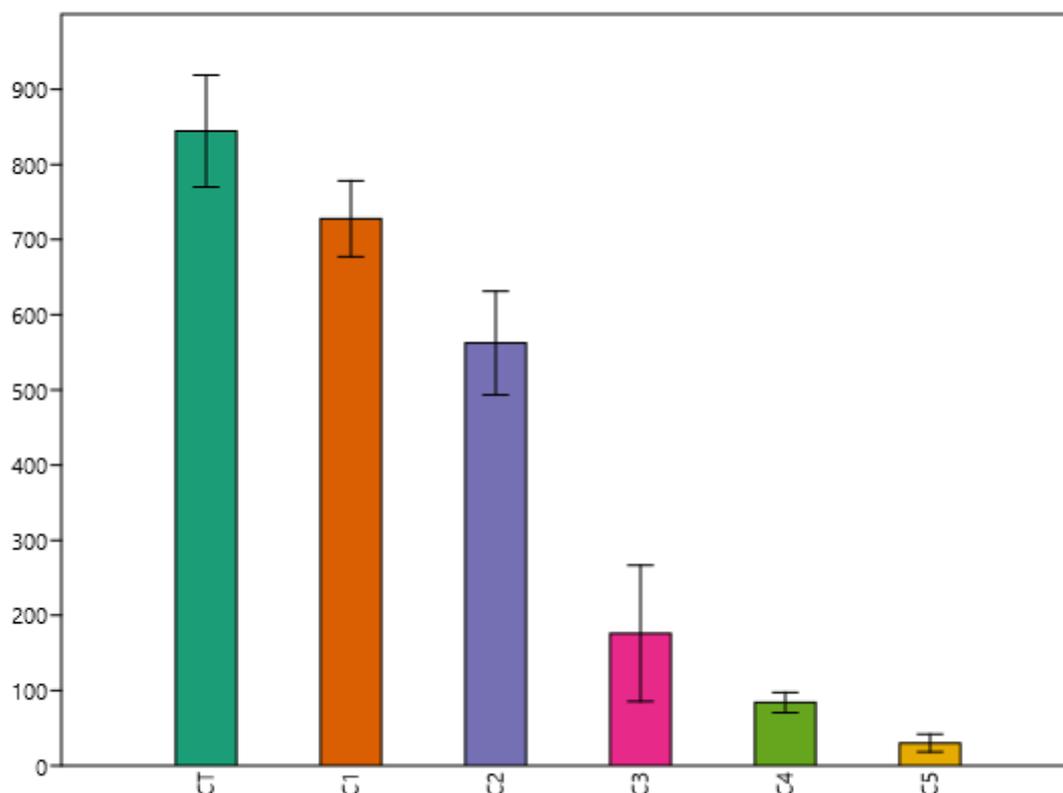
$C_{\text{médio-controle}}$ = Comprimento médio das raízes germinadas no controle.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados da avaliação ecotoxicológica com *Enchytraeus crypticus*

A Figura 4 expressa a média os resultados obtidos na contagem de organismos após 21 dias de exposição de *Enchytraeus crypticus* às concentrações de 0,2 mg/kg_{solo seco} (C1); 0,4 mg/kg_{solo seco} (C2); 1,6 mg/kg_{solo seco} (C4); 3,2 mg/kg_{solo seco} (C4) e 6,4 mg/kg_{solo seco} (C5) do fármaco ivermectina isolada. No Apêndice A são apresentados os resultados brutos da quantificação dos organismos do teste.

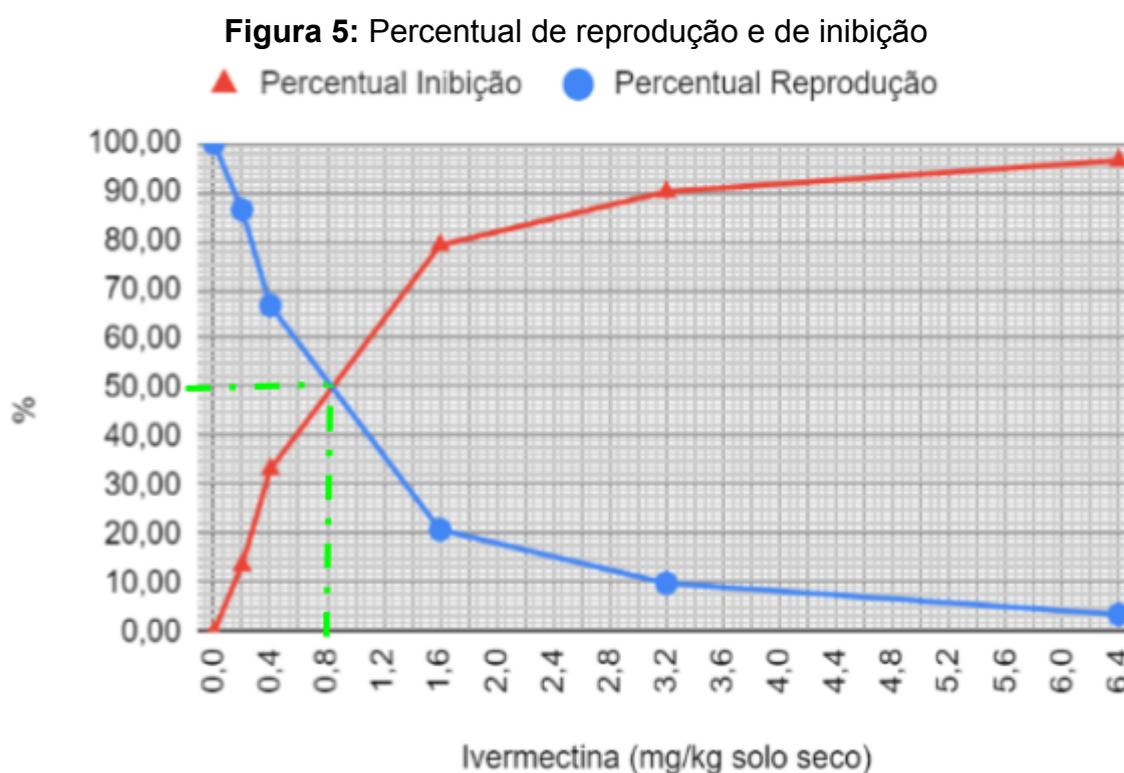
Figura 4: Desvio padrão e média de reprodução de *Enchytraeus crypticus*



Fonte: Autoria própria

Conforme ilustrado na Figura 4, nota-se que com o aumento da concentração de ivermectina houve decaimento na reprodução de organismos, sendo que na ausência de contaminante, a população atingiu a média de 819 organismos, e quando expostos a maior concentração testada (6,4 mg/kg_{solo seco}) a reprodução de organismos diminuiu consideravelmente.

Na Figura 5 estão representadas graficamente as taxas de reprodução, que são inversamente proporcionais às taxas de inibição, sendo assim, a inibição da reprodução aumentou conforme a concentração de ivermectina também aumentou.



Fonte: Autoria própria

Com a taxa de inibição, é possível identificar que a maior concentração de efeito não observado (NOAEL) foi a de 0,2 mg/kg (C1), pois apresentou uma taxa de inibição inferior a 20%. Também é possível constatar que a menor concentração de efeito observado (LOAEL) foi a de 0,4 mg/L, pois apresentou taxa de inibição inferior a 50% mas superior a 20%. Neste caso, não houve concentração em que a reprodução de organismos foi totalmente inibida, mas a maior concentração aplicada apresentou cerca de 97% de inibição.

Ainda que não seja letal nas concentrações e condições testadas, a ivermectina apresenta efeitos extremamente negativos no comportamento

reprodutivo da espécie *Enchytraeus crypticus*. Na Figura 5, isso pode ser observado mais claramente, principalmente por apresentar CE50 em concentração relativamente baixa (0,8 mg/kg_{solo seco}), na qual a reprodução de *E. crypticus* é inibida em 50%. Na análise de distribuição da normalidade, todas as concentrações apresentaram $p > 0,05$, como mostra a Tabela 6, validando os resultados obtidos neste teste.

Tabela 6: Normalidade Lilliefors L

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

Legenda: CT(controle)=0,0 mg/kg_{solo seco}; C1=0,2 mg/kg_{solo seco}; C2=0,4 mg/kg_{solo seco}; C3=1,6 mg/kg_{solo seco}; C4 = 3,2 mg/kg_{solo seco}; C5 = 6,4 mg/kg_{solo seco}.

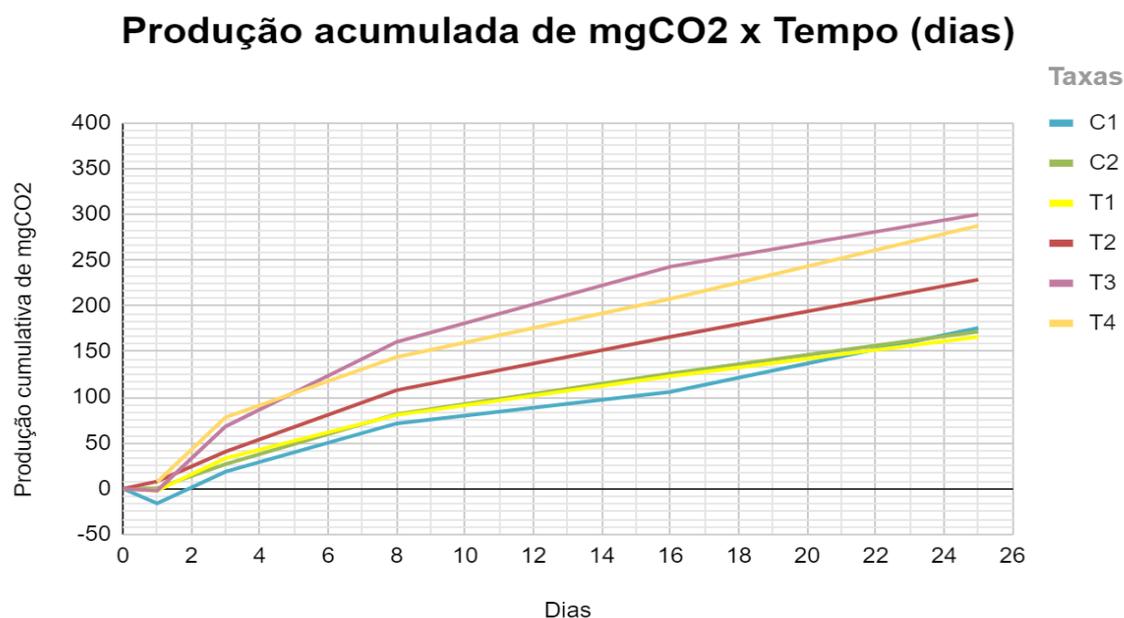
Fonte: Aatoria própria

A ivermectina também apresentou-se tóxica afetando a reprodução de *E. crypticus* no estudo feito por JENSEN *et al.* em 2003, que aplicaram o contaminante com intervalo de concentração de 0,3 a 300 mg/kg_{solo seco}, que apresentou inibição na reprodução em concentrações inferiores a 10 mg/kg_{solo seco}, e letalidade total dos organismos expostos às concentrações superiores a 10 mg/kg_{solo seco}.

5.2 Resultados do ensaio de respirométrico de Bartha e Pramer

A partir dos resultados da quantificação de CO₂ por titulação, (**Apêndice B**), calculou-se a geração acumulada de CO₂ no período do ensaio. A Figura 6 apresenta a geração de CO₂ acumulada (mg CO₂), em cada concentração, ao longo dos 25 dias do experimento.

Observa-se que a taxa de respiração apresentou-se extremamente baixa nas primeiras 24 horas do teste, com taxa negativa, aumentando consideravelmente do 1° ao 3° dia para todas as concentrações do fármaco analisadas.

Figura 6: Geração acumulada de dióxido de carbono (mgCO_2) após 25 dias

Legenda: C1 - controle; C2 - controle com adição de aditivo biológico; T1- 0,2 mg ivermectina/kg solo; T2 – 0,2 mg ivermectina/kg solo com adição de aditivo biológico; T3 – 10,0 mg ivermectina/kg solo e T4 - 10,0 mg ivermectina/kg solo com adição de aditivo biológico.

Fonte: Autoria própria

Nota-se, pelos resultados obtidos, que a adição de aditivo biológico no solo controle (C2) apresentou maior produção de mgCO_2 em relação ao solo controle sem aditivo (C1). Considerando o solo contaminado com $0,2 \text{ mg/kg}_{\text{solo seco}}$ de ivermectina e com a adição de aditivo biológico (T2), nota-se maior geração de CO_2 acumulado no período em relação ao solo contaminado com a mesma concentração sem o aditivo (T1) durante o período do teste. Já para os solos contaminados com $10 \text{ mg/kg}_{\text{solo seco}}$ de ivermectina, o solo sem aditivo (T3) apresentou maiores taxas de respiração em comparação com o solo com aditivo (T4).

Nota-se que, na ausência e na presença de baixas concentrações de ivermectina, as taxas que contém aditivo biológico apresentaram maior produção de mgCO_2 , indicando maior respiração microbiana em comparação às taxas sem aditivo biológico, com isso constata-se que a aplicação do mesmo contribui para biodegradação da Ivermectina em solo, afirmando-se o exposto por TYAGI *et al.* (2020), em sua revisão de estudos realizados com bioestimulantes, de que a aplicação de aditivos biológicos contribui para a eficiência de biodegradação de compostos tóxicos no solo. No entanto, dentre as taxas testadas, a que apresentou

maior respiração foi a com o solo contaminado com 10 mg/kg_{solo seco} de ivermectina sem a presença de aditivo biológico.

Considerando o alto valor de Koc do contaminante, é possível que a ivermectina tenha se fixado aos microrganismos e auxiliado no desempenho dos mesmos na decomposição da matéria orgânica presente no solo. A aplicação de aditivo biológico aumentou a quantidade de microrganismos, e neste caso, é possível que tenha sido reduzida a quantidade de contaminante fixado aos microrganismos presentes, por isso o menor desempenho na presença de aditivo.

5.2.1 Resultados da quantificação de bactérias heterotróficas e fungos

Realizou-se a quantificação de bactérias heterotróficas e fungos no solo natural (Tabela 7) e após o ensaio de respirometria de Bartha e Pramer (Tabela 8).

Tabela 7: Quantificação de bactérias heterotróficas e fungos do solo (UFC/g_{solo}), antes do ensaio de respirometria de Bartha e Pramer

Diluições	Fungos		Bactérias	
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
Solo natural (UFC/g _{solo})	2,2 X 10 ²	1,2 .X 10 ⁴		2,15 X 10 ⁵

Fonte: Autoria própria

Tabela 8: Quantificação de bactérias heterotróficas e fungos do solo (UFC/g_{solo}), avaliados após 25 dias do ensaio de respirometria de Bartha e Pramer

Taxa/Diluições	Fungos (UFC/g solo)		Bactérias (UFC/g solo)	
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻¹²
C1 (UFC/g _{solo})	4,8 x 10 ³	7,3 x 10 ³	*	*
C2 (UFC/g _{solo})	3,6 x10 ³	3,2 x 10 ³	*	*
T1 (UFC/g _{solo})	3,4 x 10 ³	7,15 x 10 ³	*	1,6 x 10 ¹⁴
T2 (UFC/g _{solo})	*	6,9 x10 ³	2,8 x 10 ⁵	*
T3 (UFC/g _{solo})	2,4 x 10 ³	5,9 x 10 ³	2,6 x 10 ⁵	*
T4 (UFC/g _{solo})	*	9,4 x 10 ³	*	*

Legenda: C1 - controle; C2 - controle com adição de aditivo biológico; T1- 0,2 mg ivermectina/kg solo; T2 – 0,2 mg ivermectina/kg solo com adição de aditivo biológico; T3 – 10,0 mg ivermectina/kg solo e T4 - 10,0 mg ivermectina/kg solo com adição de aditivo biológico e * resultado inconclusivo.

Fonte: Autoria própria

Nota-se que houve aumento da quantidade de microrganismos, nas diluições iniciais de cada concentração testada, indicando que a ivermectina não apresentou efeitos adversos durante o período de exposição ao solo natural durante o ensaio de respirometria de Bartha e Pramer. E, relacionando os resultados da quantificação de microrganismos aos resultados da produção de CO₂, constata-se que ambos indicam aumento da população microbiana.

5.3 Resultados do ensaios de fitotoxicidade com sementes

Os resultados obtidos quanto à variação de comportamento na germinação de sementes de alface, obtidos utilizando as equações 3, 4 e 5, estão expressos nas Tabelas 1 e 2 do Apêndice C.

Os resultados indicam que as sementes de alface expostas ao fármaco ivermectina tiveram menores taxas de germinação em relação às sementes do controle normal (CT_{a,b,c}), sendo que dentre as concentrações testadas, a de 10 mg/L (C3_{a,b,c}) apresentou menor taxa de variação, ou seja, apresentou menor redução na germinação das sementes de alface.

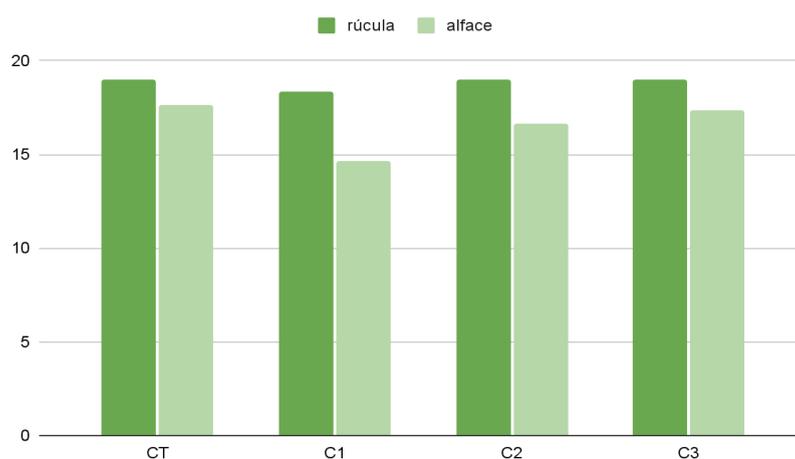
Já em relação ao resultado do comprimento de raízes das sementes de alface germinadas, a concentração testada que apresentou menor taxa de variação foi de 0,2 mg/L (C1_{a,b,c}), embora todas as concentrações testadas tenham gerado sementes germinadas com raízes de menor comprimento em relação ao controle. Desse modo, notou-se efeitos adversos quanto à exposição de sementes de alface às concentrações de ivermectina aplicadas neste estudo.

Os resultados quanto à variação no comportamento de germinação das sementes de rúcula, obtidos utilizando as equações 3, 4 e 5, estão na Tabela 1 e 2 do Apêndice D.

Quanto às sementes de rúcula, observa-se que houve redução na germinação de sementes quando expostas à 0,2 mg/L de ivermectina, a menor concentração testada, com taxa variação de 3,5% para menos, enquanto que nas concentrações maiores a taxa de germinação manteve-se igual a do controle. O cenário manteve-se semelhante quanto à taxa de comprimento de raízes, mas neste, as sementes que apresentaram menor comprimento foram as expostas à 10 mg/L de ivermectina, a maior concentração testada.

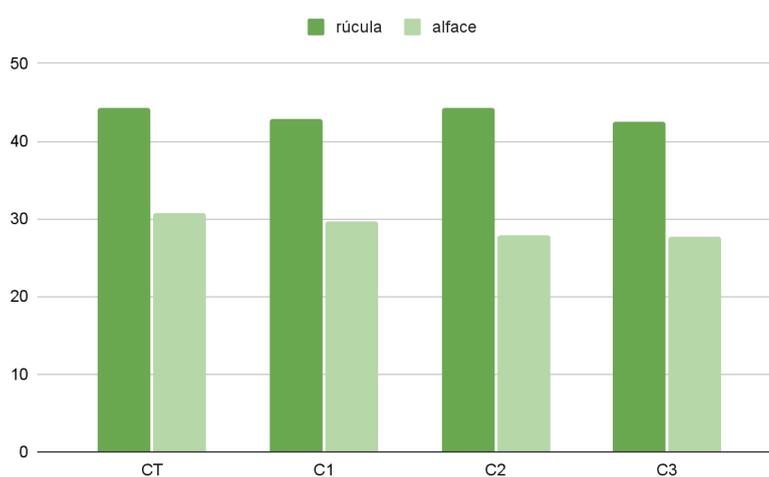
Assim, como apresentado nas Figuras 7 e 8, nota-se que as sementes de alface são mais sensíveis à exposição ao fármaco ivermectina quando comparadas às sementes de rúcula, tanto no comportamento de germinação quanto no comprimento das sementes germinadas ainda que em ambos os casos não tenham sido observados grandes efeitos adversos frente à exposição das sementes a ivermectina injetável.

Figura 7: Média de germinação de sementes de rúcula x alface



Fonte: Autoria própria

Figura 8: Comprimento médio das sementes de rúcula x alface



Fonte: autoria própria.

6 CONCLUSÕES

Assim, com os resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a ivermectina apresentou impacto mais significativo na mesofauna, avaliado pela exposição ao

organismo *Enchytraeus crypticus*, e que a redução da diversidade e abundância desses organismos pode comprometer a funcionalidade e a resiliência dos solos.

Por outro lado, os resultados indicam que as sementes de rúcula e alface apresentaram maior tolerância à presença de ivermectina, assim como a população microbiana do solo (fungos e bactérias heterotróficas), o que sugere que essas culturas podem ser menos afetadas em termos de germinação, crescimento inicial e, no caso das populações microbianas, a respiração biológica.

Diante do exposto, é necessário considerar a necessidade de regulamentação e monitoramento adequados para o uso da ivermectina, especialmente em atividades agrícolas e pecuárias, pois a partir dessas informações, podem ser desenvolvidas estratégias de mitigação e manejo adequadas, visando a proteção da biodiversidade e a sustentabilidade dos ecossistemas terrestres.

Este estudo fornece evidências importantes sobre os potenciais efeitos da ivermectina na mesofauna, nas sementes de rúcula e alface e na população microbiana do solo. No entanto, é importante ressaltar que esses testes foram realizados em condições controladas de laboratório e que os efeitos a longo prazo no desenvolvimento das plantas e na diversidade e atividade microbiana devem ser investigados a fundo. Para tal, sugere-se a aplicação de mais pesquisas para compreender completamente os mecanismos envolvidos e os efeitos a longo prazo da exposição à ivermectina em diferentes sistemas ecológicos e níveis tróficos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 16387 - Qualidade do solo - efeitos de poluentes em *Enchytraeidae* (*Enchytraeus sp.*) - Determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência**. 2012.

ABIEC - Associação Brasileira das das Indústrias Exportadoras de Carne. **To promote Brazilian beef exports, reinforcing its quality and safety in Brazil and worldwide**. 2023. Disponível em: <<https://www.abiec.com.br/exportacoes/>>. Acesso em 22 jun. 2023.

CASTRO-FERREIRA, M. P.; ROELOFS, D.; VAN GESTEL, C. A. M.; VERWEIJ, R. A.; SOARES, A. M. V. M.; AMORIM, M. J. B. *Enchytraeus crypticus* as a model species in soil ecotoxicology. **Chemosphere**. v. 87, e. 11, p. 1222-1227, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.021>>. Acesso em: 09 mai 2023.

D'ANDREA, P. A. Microbiol Indústria e Comércio LTDA. **Processo de compostagem líquida contínua – CLC e biofertilizante**. BR.n.PI0207342-0. Dez, 2010.

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

FERREIRA, F.O.; PORTO, R.S.; RATH, S. Aerobic dissipation of avermectins and moxidectin in subtropical soils and dissipation of abamectin in a field study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 183, 2019, p. 109489, Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651319308206>>. Acesso em: 04 jun 2023.

GONÇALVES, M. F. M.; GOMES, S. I. L.; SOARES, A. M.V.M.; AMORIM, M. J. B. *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta) is able to regenerate - considerations for a standard ecotoxicological species. **Applied Soil Ecology**. v. 107, p. 320-323, 2016. Disponível: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139316302013>>. Acesso em: 09 mai 2023.

GRANZOTO, M. R. **Toxicidade do fipronil sobre enquitreídeos em solo natural - teste multigeracional**. 2018. 37 f. Dissertação (Mestre em Tecnologia) - Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas, Limeira, São Paulo, 2018.

JENSEN, J; DIAO, X; HANSEN, A. D. Single-and two-species tests to study effects of the anthelmintics ivermectin and morantel and the coccidiostatic monensin on soil invertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 28, n. 2, p. 316-323, 2009.

JENSEN, J.; KROGH, P.H.; SVERDRUP, L.E. Effects of the antibacterial agents tiamulin, olanquinox and metronidazole and the anthelmintic ivermectin on the soil

invertebrate species *Folsomia fimetaria* (Collembola) and *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae). **Chemosphere**, v. 50, ed. 3, 2003, p. 437-443. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653502003363>>. Acesso em 04 jun. 2023.

JIN, M-K.; ZHANG, Q.; YANG, Y-T.; ZHAO, C-X.; LI, J.; LI, H.; QIAN, H.; ZHU, D.; ZHU, Y-G. Exposure to cypermethrin pesticide disturbs the microbiome and disseminates antibiotic resistance genes in soil and the gut of *Enchytraeus crypticus*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 449, 2023. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389423003084>>. Acesso em 20 jun. 2023.

KOLAR L.; KOZUH, E.N.; HOGERWERF L.; VAN GESTEL C.A. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. **Environ Pollut**, p. 151-189, ed. 9, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026974910700108X>>. Acesso em: 21 jun. 2023.

LOVADOURO, J. H. B.; MATOS, C. B.; LEITE, A. T. M.; CLEFF, M. B. Intoxicação por ivermectina em cães. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages, v. 13, n. supl., p. 55-56, 2013. Disponível: <<https://www.revistas.udesc.br/index.php/agroveterinaria/article/download/5523/3750/15325>>. Acesso em: 11 mai 2023.

MAZZEO, D.E.C.; MISOVIC, A.; OLIVEIRA, F.A.; LEVY, C.E.; OEHLMANN, J. MARCHI, M.R.R. Effects of biostimulation by sugarcane bagasse and coffee grounds on sewage sludges, focusing agricultural use: Microbial characterization, respirometric assessment and toxicity reduction. **Waste Management**, v.18, p. 110-121, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X2030475X>>. Acesso em: 21 jun. 2023.

MICROGEO BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA. **Manual Técnico: Microgeo Star e Microgeo**. Disponível em: https://microgeo.com.br/site/wp-content/uploads/2022/01/5977_1-MANUAL-TECNICO-2022.pdf. Acesso em 20 mar. 2022

MOLBASE. **Ivermectina.** Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=ivermectin>. Acesso em 18 jun. 2021.

MOLENTO, M. B. Ivermectiva e saúde única: reposicionamento e a preocupação com o meio ambiente. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, São Paulo, v. 19, n. 1, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.36440/recmvz.v19i1.38175>> Acesso em: 29 abr 2023.

MONTAGNOLLI, R.N.; LOPES, P.R.M.; BIDOIA, E.D. Applied models to biodegradation kinetics of lubricant and vegetable oils in wastewater, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, e. 3, 2009, p. 297-305. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830508001820>>. Acesso em: 06 jun 2023.

NEMAPLEX. **Characteristics of Taxonomic Groups with Soil-inhabiting Forms.** Disponível em: <<http://nemaplex.ucdavis.edu/Kingdoms/Annelida.htm>>. Acesso em: 10 mai 2023.

NIVA, C. C.; RÖMBKE, J.; SCHMELZ, R. M.; BROWN, G. G. Enquitreídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). **Manual de Biologia dos Solos Tropicais Amostragem e Caracterização da Biodiversidade - UFLA**, v. 1, c. 13, p. 351-361, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/235763505_Enquitreideos_Enchytraeidae_Oligochaeta_Annelida>. Acesso em: 30 abr. 2023.

NOVAIS, S.; AMORIM, M. J. B.; RÖMBKE, J.; SOARES, A. M. V. M. Testes de evitamento com enquitraídeos (*Enchytraeus albidius*): efeitos de diferentes tempos de exposição, compostos químicos e propriedades do solo. **CAPTAR ciência e ambiente para todos**, v. 1, n.1, p. 104-112, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.34624/captar.v1i1.11019>>. Acesso em: 29 abr. 2023.

OECD - Organization for economic Cooperation and development. **Test nº 307 - Aerobic and anaerobic transformation in soil.** 2002. 17 p. Disponível em: <<https://doi.org/10.1787/9789264070509-en>>. Acesso em 06 jun. 2023.

PUBCHEM. **Ivermectina.** Disponível em:
https://www.molbase.com/cas/search?search_type=text&keyword=ivermectin.
Acesso em 19jun. 2021.

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

SANTIAGO, F.E.M; SILVA, M.L.S.; CARDOSO, A.A.S.; DUAN, Y.; GUILHERME, L.R.G.; LIU, J; LI, L. Biochemical basis of differential selenium tolerance in arugula (*Eruca sativa* Mill.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 157, 2020, p. 328-338. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942820305520>>. Acesso em 04 jun. 2023.

SIGMAALDRICH. **Ivermectina.** Disponível em:
https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/70288-86-7?focus=products&gclid=Cj0KCQjwjo2JBhCRARIsAFG667XvOy_DT56NQdDgiqnW2SdrgFbueL6CQFYjEaMrQRhJHULy4SGJVUAaArcxEALw_wcB&page=1&perPage=30&sort=relevance&term=70288-86-7&type=cas_number. Acesso em: 18 jun. 2021.

SOLDERA, P.E.S.; FIGUEIREDO, T.S; DANTAS, R.F.; FAGNANI, E. Respirimetria de Bartha como ferramenta na avaliação da decomposição anaeróbia de efluentes de abatedouros. **Revista DAE**, São Paulo, v. 68, n. 225, pp 80-92, ed. esp. set. 2020.

SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas: **IAC - Instituto Agronômico**, 312 p., 2007. Disponível em:
<<https://www.iac.sp.gov.br/publicacoes/arquivos/microbiota.pdf>>. Acesso em: 22 jun. 2023.

SINDAN. 2020. Disponível em: <http://www.sindan.org.br/mercado-brasil/>. Acesso em: 13 dez. 2020

SOUZA, F.M.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. Lavras: **Editora UFLA**, ed. 2, 729 p., 2006. Disponível em:
<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lso/arquivos_aula/LSO_400%20Livro%20-

%20Microbiologia%20e%20bioquimica%20do%20solo.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2023.

SOUZA, R.B., SOUZA, C.P. & GUIMARÃES, J.R. Environmentally realistic concentrations of eprinomectin induce phytotoxic and genotoxic effects in *Allium cepa*. **Environ Sci Pollut Res**, ed. 29, p. 80983–80993, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-022-21403-7>>. Acesso em 20 jun. 2023.

TUERLINCKX, S. M., MORSELLI, T. B. G. A., & HUBER, A. C. K. Indução de ivermectina na hormese sobre *Eisenia foetida* durante a vermicompostagem de esterco bovino. **Revista Brasileira De Engenharia Agrícola E Ambiental**, ed. 19, v. 7, p. 698–704, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v19n7p698-704>>. Acesso em: 22 jun. 2023.

TYAGI, M.; FONSECA, M.M.R.; CARVALHO, C.C.C.R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradations**, ed. 22, p. 231-241, 2011. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10532-010-9394-4#citeas>>. Acesso em 20 jun. 2023.

VSDB: Veterinary Substances DataBase - ivermectina. **Agriculture & Environment Research Unit (AERU), University of Hertfordshire**, 2021. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/Reports/1455.htm#none>>. Acesso em 30 abr. 2023

VOKŘÁL, I.; MICHAELA, Š.; RADKA, P.; JIŘÍ, L.; LUKÁŠ, P.; DOMINIKA, S.; KATEŘINA, L.; BARBORA, S.; LENKA, S. Ivermectin environmental impact: Excretion profile in sheep and phytotoxic effect in *Sinapis alba*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, 2019, p. 944-949. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651318312429>>. Acesso em: 02 jun 2023.

ZORTÉA T.; SEGAT J.C.; MACCARI A.P.; SOUSA J.P.; DA SILVA A.S.; BARETTA D. Toxicity of four veterinary pharmaceuticals on the survival and reproduction of *Folsomia candida* in tropical soils. **Chemosphere**. ed. 173, p. 460-465, 2017. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653517300796>>. Acesso em: 18 jun. 2023.

8 APÊNDICES

Apêndice A

Reprodução de reprodução de *Enchytraeus crypticus*

	Ivermectina (mg/kg solo seco)	Replicatas	n° Organismos	Média
Controle	0	A	958	840
		B	885	
		C	747	
		D	786	
		E	834	
		F	834	
		G	856	
C1	0,2	A	814	727
		B	728	
		C	687	
		D	712	
		E	698	
C2	0,4	A	515	562
		B	531	
		C	683	
		D	556	
		E	527	
C3	1,6	A	223	176
		B	169	
		C	304	
		D	89	
		E	95	
C4	3,2	A	102	84
		B	77	
		C	86	
		D	66	
		E	89	
C5	6,4	A	34	30
		B	21	
		C	22	
		D	49	
		E	24	

Fonte: Autoria própria

Apêndice B

Tabela 1- Consumo de HCl por concentração na titulação do KOH nos respirômetros de Bartha e Pramer

Data	Controle (C1)			Controle (C2)			Taxa 1 (T1)			Taxa 2 (T2)			Taxa 3 (T3)			Taxa 4 (T4)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
12/05	22,2	16,7	18,1	17,9	19,2	17,4	17,5	18,9	18,5	17,6	18,4	17,4	18,6	18,5	17,8	18,5	18,0	17,0
14/05	15,8	17,6	17,8	17,4	18,0	17,0	17,8	17,5	15,8	17,5	17,2	16,8	16,0	15,4	14,8	15,8	15,5	14,8
19/05	16,5	16,9	16,2	16,0	16,7	16,6	16,9	16,7	16,8	16,5	15,2	15,8	14,5	15,1	14,2	16,4	15,8	15,1
27/05	17,1	16,5	16,4	16,2	15,6	16,7	16,9	15,7	16,2	15,1	15,2	16,1	14,4	14,1	14,3	15,5	15,6	14,5
05/05	16,9	12,8	16,6	16,8	16,9	16,2	16,7	17,2	16,4	15,9	16,2	15,3	16,1	16,5	15,6	15,8	16,2	12,8

Fonte: Autoria própria

Tabela 2 - Padronização de soluções utilizados no ensaio de respirometria de Bartha e Pramer

Padronização de soluções						
Data	Dias	NHCl	NKOH	HCl	KOH	BR
11/05	1	0,0943	0,1792	21,20	19,00	18,30
12/05	2	0,0913	0,1680	21,90	18,40	18,20
14/05	4	0,0966	0,1855	20,70	19,20	18,70
19/05	9	0,0935	0,1766	21,40	18,90	19,10
27/05	17	0,0905	0,1792	22,10	19,80	18,40
05/05	26	0,0917	0,1789	21,80	19,50	18,90

Fonte: Autoria própria

Tabela 3 - Produção diária de mgCO₂ avaliada no ensaio de respirometria de Bartha e Pramer

Respirometria - Produção Diária de mgCO ₂							
Data	Dias	C1	C2	T1	T2	T3	T4
11/05	0	0	0	0	0	0	0
12/05	1	-16,0731	0,6697	-2,0091	8,0365	-2,0091	7,3668
14/05	3	34,7182	26,2158	35,4267	32,5926	70,1449	70,8535
19/05	8	52,7726	54,8287	47,2897	67,1651	92,5234	65,7944
27/05	16	34,5098	44,4646	42,4736	58,4012	82,2926	63,7104
05/05	25	69,9694	45,7492	43,0581	62,5688	57,1865	80,0612

Fonte: Autoria própria

Tabela 4 - Produção acumulada de mgCO₂ avaliada no ensaio de respirometria de Bartha e Pramer

Respirometria - Produção Acumulada de mgCO ₂							
Data	Dias	C1	C2	T1	T2	T3	T4
11/05	0	0	0	0	0	0	0
12/05	1	-16,0730	0,6697	-2,0091	8,0365	-2,0091	7,3668
14/05	3	18,6451	26,8855	33,4175	40,6291	68,1357	78,2203
19/05	8	71,4177	81,7142	80,7073	107,7942	160,6591	144,0146
27/05	16	105,9275	126,1787	123,1809	166,1954	242,9517	207,7250
05/05	25	175,8969	171,9279	166,2390	228,7642	300,1383	287,7862

Fonte: Autoria própria

Apêndice C

Tabela 1 - Comprimento de raízes alface

ALFACE (mm)												
n° de sementes	CTa	CTb	CTc	C1a	C1b	C1c	C2a	C2b	C2c	C3a	C3b	C3c
1	43	35	37	33	34	39	42	39	41	34	27	38
2	37	35	48	35	35	34	42	44	40	31	29	29
3	41	43	42	38	34	42	44	41	34	29	34	39
4	35	36	44	36	34	28	31	44	42	29	33	37
5	39	42	33	38	36	38	35	32	31	22	40	30
6	40	34	45	37	39	25	32	35	41	24	39	35
7	30	50	46	34	33	28	34	34	32	40	23	27
8	35	27	35	37	34	42	29	30	28	27	35	31
9	32	43	36	33	33	35	34	42	41	29	32	27
10	38	39	38	27	28	28	25	23	29	28	25	26
11	38	44	35	4	34	19	29	37	30	32	31	31
12	10	33	35	6	37	26	35	10	19	28	24	29
13	17	20	34	7	24	32	37	13	20	26	21	33
14	10	11	29	6	15	33	5	18	9	24	29	29
15	5	4	45	8	4	8	4	7	7	21	27	14
16	11	3	43	4	3	18	6	11	6	29	29	7
17	11		14			5	7	8	6	25	7	4
18	5		7			3		3		7		3
19	5											5
20	8											

Fonte: Autoria própria

Tabela 2 - Variação de resultados de germinação de sementes de alface

		CONTROLE			C1 = 0,2 mg/L ivermectina			C2 = 3,2 mg/L ivermectina			C3 = 10,0 mg/L ivermectina		
		CTa	CTb	CTc	C1a	C1b	C1c	C2a	C2b	C2c	C3a	C3b	C3c
comprimento total	replicata	490	492	646	375	450	480	467	468	456	485	485	467
	média	543			435			464			479		
sementes germinadas	replicata	20	15	18	14	14	16	16	17	17	18	17	17
	média	18			15			17			17		
% variação germinação					-17			-5,7			-1,9		
comprimento médio		31			30			28			28		
% variação comprimento					-3,4			-9,4			-10		

Fonte: Autoria própria

Apêndice D

Tabela 1 - Comprimento de raízes rúcula

RÚCULA (mm)												
n° de sementes	CTa	CTb	CTc	C1a	C1b	C1c	C2a	C2b	C2c	C3a	C3b	C3c
1	43	54	46	51	50	17	39	67	67	55	46	39
2	42	57	45	40	42	43	38	43	4	41	45	39
3	44	53	47	68	27	50	45	45	45	32	42	36
4	51	60	46	48	63	50	45	38	38	45	44	43
5	49	49	46	26	50	43	41	50	50	53	27	51
6	41	45	44	32	53	35	40	35	35	35	52	45
7	49	36	41	52	56	54	34	44	44	36	44	44
8	43	61	50	45	40	45	50	44	44	45	55	44
9	53	43	46	51	41	43	42	43	43	26	42	38
10	45	29	55	29	36	40	51	55	55	44	44	43
11	45	41	33	53	60	47	49	57	57	39	47	42
12	41	46	47	60	45	41	40	40	40	47	54	50
13	31	25	40	36	60	50	60	42	42	45	41	56
14	39	38	48	46	40	30	60	44	44	37	35	55
15	17	50	46	55	36	40	60	40	40	42	36	54
16	51	48	57	45	45	58	58	43	42	43	39	32
17	46	44	30	44	37	45	55	37	37	43	29	49
18	40	35	47	4	40	4	42	37	37	45	4	44
19	50	4	32	3	11	6	40	62	62	43		54
20	40		4	5			10			40		10

Fonte: Autoria própria

Tabela 2- Variação de resultados de germinação de sementes de rúcula

		CONTROLE			C1 = 0,2 mg/L ivermectina			C2 = 3,2 mg/L ivermectina			C3 = 10,0 mg/L ivermectina		
		CTa	CTb	CTc	C1a	C1b	C1c	C2a	C2b	C2c	C3a	C3b	C3c
comprimento total	replicata	860	818	846	786	832	737	899	798	826	836	722	868
	média		841			785			841			809	
sementes germinadas	replicata	20	18	19	18	19	18	20	18	19	20	17	20
	média		19			18			19			19	
% variação germinação						-3,5			0			0	
comprimento médio			44			43			44			43	
% variação crescimento						-3,3			0			-3,9	

Fonte: Autoria própria