

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

**BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS E
ECOTOXICIDADE POR COBRE EM *Eisenia andrei*
(Bouché 1972)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Talita Ferreira

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS E ECOTOXICIDADE
POR COBRE EM *Eisenia andrei* (Bouché 1972)**

Talita Ferreira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, **Área de Concentração em Organismos do Solo e Insumos Biológicos à Agricultura**, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência do Solo**.

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Zaida Inês Antonioli

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo


A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

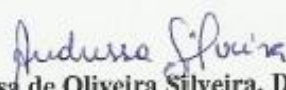
BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS E ECOTOXICIDADE POR COBRE EM
Eisenia andrei (Bouché 1972)

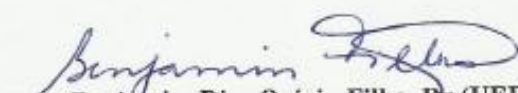
elaborada por
Talita Ferreira

como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência do Solo

COMISSÃO EXAMINADORA


Zaida Inês Antoniolli, Dr.^a. (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Andressa de Oliveira Silveira, Dr.^a. (UFSM)
(Examinadora)


Benjamin Dias Osório Filho, Dr (UERGS)
(Examinador)

Santa Maria, 16 outubro de 2015.

*Milton e Terezinha dedico esse
trabalho a vocês.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Milton Ferreira e Terezinha Kuiawa Ferreira, pelo amor, educação, apoio incondicional e exemplo de persistência na vida. Aos meus irmãos Thayná Ferreira e José Vitor Ferreira pelas alegrias, amizade, apoio e paciência. Obrigada por tudo, amo vocês.

À minha Orientadora Prof^a. Dr^a. Zaida Inês Antonioli pela amizade, aprendizagem e paciência.

À Dr^a. Bárbara Estevão Clasen pela co-orientação, amizade, ajuda e ensinamentos.

Ao Professor Dr. Rodrigo J. S. Jacques, pelos ensinamentos, amizade e incentivos.

Ao Seu Otávio e a Dona Irma que me acolheram nessa cidade, muito obrigada.

A todos os colegas e amigos do laboratório de Biologia do Solo e Ambiente: Anderson, Antonio, Ângela, Caroline B., Caroline R., Cristiane, Daiana, Daiane, Daniel, Edicarla, Eduardo, Hazael, Joice, Juliane, Mirian, Natielo, Nariane, Willian, Valdemir, Valéria pela amizade e companheirismo, que tornam o ambiente de trabalho alegre e agradável.

Aos professores do Departamento de Solos: Carlos Alberto Ceretta, Celso Aita, Leandro da Silva, Sandro Giacomini, José Miguel, Ricardo Dalmolin, Fabrício Pedron, Paulo Gubiani, Gustavo Brunetto, Jean Minella pelo aprendizado durante o curso.

Aos componentes da banca examinadora, agradeço pelo aceite e disponibilidade.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo por ter oferecido a oportunidade da realização de mais um sonho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Muito Obrigada!

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”. (Marcel Proust)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo
Universidade Federal de Santa Maria

BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS E ECOTOXICIDADE POR COBRE EM *Eisenia andrei* (Bouché 1972)

AUTOR: Talita Ferreira
ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Zaida Inês Antonioli
Data e local da defesa: Santa Maria, 16 de outubro de 2015.

O uso indiscriminado de insumos agrícolas pode causar a poluição dos solos, comprometendo a flora, fauna e as relações ecológicas. Dentre os insumos químicos utilizados na agricultura, destaca-se a calda bordalesa. Sua intensa utilização resulta em uma adição considerável de cobre ao solo, podendo causar danos aos organismos expostos. O presente estudo teve como objetivo determinar os efeitos toxicológicos de diferentes doses de cobre: 0, 35, 70, 105, 140 e 175 mg.Kg⁻¹ aplicado ao solo, na biomassa e reprodução das minhocas *Eisenia andrei*, através dos testes ecotoxicológicos assim como os efeitos da exposição a nível enzimático antioxidante, através das enzimas catalase e glutathione S-transferase (CAT e GST), sobre biomarcadores de neurotransmissão como a acetil-colinesterase (AChE) e na peroxidação lipídica da membrana celular através dos níveis de malondialdeído (MDA). Os resultados ecotoxicológicos, evidenciaram que as maiores doses de cobre testadas, (140 e 175 mg.Kg⁻¹) foram tóxicas, pois as minhocas apresentaram redução média na biomassa e no número de casulos. Em relação aos níveis enzimáticos, foi observado um incremento na atividade das enzimas glutathione-S-transferase, como mecanismo de defesa antioxidante. O aumento significativo nos níveis de MDA observados e a inibição da atividade da acetil-colinesterase, indicam a ocorrência da peroxidação lipídica da membrana celular e alterações na neurotransmissão em decorrência do estresse oxidativo ocasionado pela presença do metal.

Palavras-Chave: Ecotoxicologia, metal pesado, minhoca, enzimas antioxidantes

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Soil Science
Federal University of Santa Maria

BIOMARKERS ENZYME AND ECOTOXICITY OF COPPER IN *Eisenia andrei* (Bouché 1972)

AUTHOR: TALITA FERREIRA
ADVISOR: Zaida Inês Antonioli
Date: Santa Maria, 16-10-2015

The indiscriminate use of agricultural supplies can cause soil pollution, affecting the flora, fauna and ecological relationships. Among these chemical compounds used in agriculture, there is the Bordeaux mixture. The intense use of this fungicide results in a considerable copper addition in the soil, may cause damage to exposed organisms. This study aimed to evaluate the toxicological effects of different copper doses, (0, 35, 70, 105, 140 e 175 mg.Kg⁻¹) applied in soil, at earthworms *Eisenia andrei* biomass and reproduction, through ecotoxicological tests as well as the effects of exposure to antioxidant enzyme activity, by the enzymes catalase and glutathione S-transferase (GST and CAT), on neurotransmission biomarkers such as acetylcholinesterase (AChE) and cell membrane lipid peroxidation through the levels of malondialdehyde (MDA). The ecotoxicological results showed that the largest copper doses tested, (140 e 175 mg.Kg⁻¹) were toxic, because the worms had a mean biomass reduction and cocoons. In the enzyme assessments, an increase in the glutathione-S-transferase activity was observed as the antioxidant defense mechanism. The significant MDA levels increase and the acetylcholinesterase activity inhibition, indicating the cell membrane lipid peroxidation occurrence and neurotransmission changes as a result of oxidative stress caused by the metal.

Key words: Ecotoxicology, heavy metal, earthworm, antioxidant enzyme

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1 Bioindicadores da qualidade do solo	11
1.2 Contaminação do solo por cobre	14
1.3 Minhocas <i>Eisenia andrei</i> (Bouché 1972)	14
1.4 Ecotoxicologia terrestre	15
1.5 Efeitos morfológicos.....	17
1.6 Estresse oxidativo	17
1.7 Referências	21
2 ARTIGO I- RESPOSTAS ECOTOXICOLÓGICAS DE <i>Eisenia andrei</i> AO COBRE	31
2.1 Resumo	31
2.2 Introdução	32
2.3 Material e Métodos	33
2.3.1 Solo utilizado.....	33
2.3.2 Testes ecotoxicológicos.....	34
2.3.3 Teste de Toxicidade Aguda com solo contaminado	34
2.3.4 Análise Estatística	35
2.3.5 Teste de Toxicidade Crônica em solo contaminado.....	35
2.3.6 Análise Estatística	37
2.4 Resultados e Discussão	37
2.4.1 Teste de Toxicidade Aguda	37
2.4.2 Teste de Toxicidade Crônica	40
2.5 Conclusões	42
2.6 Referência	43
3 ARTIGO II- Enzimas antioxidantes em <i>Eisenia andrei</i> exposta a solo contaminado com cobre	48
3.1 Resumo	48
3.2 Introdução	49
3.3 Material e Métodos	50
3.3.1 Solo utilizado	50
3.3.2 Condições experimentais	51
3.3.3 Ensaio Bioquímico	51
3.3.4 Atividade da Catalase (CAT).....	52
3.3.5 Glutathione S-Transferase (GST)	52
3.3.6 Acetil-colinesterase (AChE).....	52

3.3.7 Ensaio de Peroxidação Lipídica (TBARS).....	53
3.3.8 Determinação de Proteínas	53
3.3.9 Análise Estatística	53
3.4 Resultados e Discussão	54
3.4.1 Efeito do cobre sobre a atividade da enzima GST em <i>Eisenia andrei</i>	54
3.4.2 Efeito do cobre sobre a atividade da enzima AChE em <i>Eisenia andrei</i>	56
3.4.3 Efeito do cobre sobre a atividade da enzima CAT em <i>Eisenia andrei</i>	58
3.4.4 Efeito do cobre no nível de peroxidação lipídica em <i>Eisenia andrei</i>	59
3.5 Conclusões	61
3.6 Referência	62

1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de insumos agrícolas é essencial para manter a alta produtividade e a fertilidade dos solos cultivados. No entanto, o uso indiscriminado e abusivo desses compostos pode causar degradação e contaminação dos recursos naturais, influenciando negativamente a biota do solo (BROWN & DOMÍNGUEZ, 2010).

Dentre os agrotóxicos mais utilizados no estado do Rio grande do Sul destaca-se a calda bordalesa, um fungicida composto de uma mistura de óxido de cálcio e sulfato de cobre, usado no controle do míldio em videiras (GIROTTO et al., 2014). Este fungicida é amplamente utilizado, em especial na serra gaúcha, maior região vitivinícola do Brasil, resultando em uma adição anual considerável de cobre ao solo, aumentando assim a toxicidade e contaminação do meio ambiente (MIOTTO et al., 2014). Segundo Brun (1998), o uso continuado dos fungicidas cúpricos pode adicionar ao sistema quantidades de cobre acima da capacidade máxima de adsorção, aumentando sua quantidade nas formas solúveis e ultrapassando o teor crítico do solo.

A presença deste metal pesado afeta todo o ecossistema, e pode levar à exclusão da biota do solo, como a minhoca, alterando de maneira negativa a flora, a fauna e todas as relações ecológicas (OLIVEIRA, 2014). Por isso, o conhecimento do grau de contaminação é fundamental para o monitoramento do potencial de persistência deste composto no solo (ANDRÉA, 2010).

A contaminação do solo traz grande preocupação, dada a importância deste recurso natural como reservatório de água e nutrientes para plantas e como habitat para organismos decompositores (ANDRÉA, 2010). No entanto, o estudo de áreas contaminadas em solos brasileiros é ainda precário, visto que somente em 2009 o Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA publicou uma resolução (n: 420 de 28 de dezembro de 2009) que estabelece critérios e valores de qualidade do solo. Estes critérios são definidos em função das propriedades químicas, e a qualidade do solo pode ser descrita como a capacidade do solo funcionar dentro dos limites ambientais, garantindo o sustento da produtividade biológica e a saúde animal e vegetal (DORAN et al., 2000).

A agência ambiental brasileira estabelece que teores superiores a 60 mg.Kg^{-1} de cobre no solo sinaliza a necessidade de medidas corretivas destinadas a restabelecer sua qualidade.

Já a Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM) elaborou a portaria N°. 85/2014, que estabelece valores de referência de qualidade para solos do Rio Grande do Sul. Para os solos da Depressão Central o valor de referência do cobre é de 13 mg.Kg⁻¹.

Porém, no momento da avaliação levam-se em conta apenas parâmetros químicos, que muitas vezes não representam o comportamento deste contaminante no ambiente como um todo. Tem-se buscado então parâmetros que sirvam de indicadores da qualidade geral do solo e do ambiente (BROWN & DOMÍNGUEZ, 2010). Os parâmetros biológicos têm sido usados frequentemente para esta finalidade por apresentarem maior sensibilidade na detecção destes poluentes.

1.1 Bioindicadores da qualidade do solo

Bioindicadores são indivíduos ou comunidades que fornecem informações sobre a condição de um ecossistema, demonstrando a presença de alterações ambientais (LIJTEROFF, 2009). São componentes importantes na função do solo e qualquer alteração que ocorra na sua propriedade é provável que os afetem (LAVELLE et al., 2006). Muitos organismos são incapazes de se adaptar às condições ambientais modificadas, apresentando alterações no comportamento, fisiologia, de modo que sua ausência no ambiente de fato, já indica um problema (GARCIA et al., 2008).

A utilização de bioindicadores possibilita determinar a concentração dos poluentes que influenciam os organismos, bem como o padrão de contaminação e a biodisponibilidade. Para escolha do organismo teste deve-se levar em consideração a representatividade dentro do ambiente que ocupa e a sensibilidade ao agente químico (ANDRÉA, 2010). É crescente o número de estudos desenvolvidos nos últimos anos avaliando o potencial bioindicativo de organismos de diferentes níveis tróficos, tais como colêmbolos, ácaros, enquitreídeos e minhocas (BARETTA et al., 2014; ANDRÉA, 2010; ZHU et al., 2008; RODRÍGUEZ-CASTELLANOS & SANCHES-HERNANDEZ, 2007; CURRY, 2004).

Dentre esses bioindicadores terrestres, um dos grupos zoológicos mais estudados é o grupo Annelida, da família Lumbricidae (BERNARD et al., 2010). As minhocas, representam uma parte importante da biomassa da macrofauna, e são considerados prestadores de serviços essenciais aos ecossistemas (BLOUIN et al., 2013), como manutenção da estrutura e fertilidade dos solos (AMOSSÉ et al., 2015), formação de húmus e agregados (YVAN et al.,

2012), melhoramento da porosidade, infiltração e retenção da água (FIUZA., 2012), decomposição de resíduos e ciclagem de nutrientes (ANTONIOLLI., 2009).

As minhocas são fortemente afetadas pelas substâncias tóxicas presente no solo, pois ao ingerir resíduos desses contaminantes durante sua alimentação podem incorporar e até bioacumular esses poluentes em seus tecidos (CURRY, 2004). Desta forma, estes organismos são considerados excelentes bioindicadores da contaminação do solo em função do hábito alimentar, comportamento, habitat, por serem afetadas pela poluição de metais, por influenciarem no destino e na distribuição dos produtos químicos no solo (DOMINGUEZ & PÉREZ-LOSADA, 2010). Além disso são organismos de fácil reprodução em laboratório com alta taxa reprodutiva em curto período de tempo (FOUNTAIN & HOPKIN, 2005). A avaliação da toxicidade que uma substância química causa na minhoca é feita através da observação em parâmetros do organismo, como mortalidade, crescimento, reprodução e/ou através do seu comportamento, entre outros (CESAR et al., 2013; JUBILEUS et al., 2013; ASENSIO, 2007; MABOETA & FOUCHÉ, 2014; WU et al., 2012; MA, 2005).

Minhocas são frequentemente utilizadas como bioindicadores da contaminação por cobre (Tabela 1). Esses organismos, em contato com solo contaminado por metais podem apresentar retardo na maturação sexual (SPURGEON et al.,1996), alterações na atividade enzimática (LASZCZYCA et al., 2004), modificações na expressão de genes (BRULLE et al., 2007), entre outros. Estas alterações observadas nos organismos são utilizadas como indicativos de contaminação em testes ecotoxicológicos.

Tabela 1 – Espécies de minhocas utilizadas em estudos como bioindicadores da contaminação por cobre.

Espécies de Minhocas	Ambiente	Teor de Cu (mg.Kg⁻¹)	Avaliação	Resultados	Referências
<i>E. andrei</i>	Solos África do Sul	39 - 605 -6925	Biomassa Reprodução	Biomassa (-)* Reprodução (-)	MABOETA & FOUCHÉ (2014)
<i>L. rubellus e L.castaneus</i>	Solos de fundição	5 – 100	Teor de cobre Sobrevivência Produção de casulos	Produção casulo (-)	MA (2005)
<i>L. rubellus e L.castaneus</i>	Solos com resíduos metalúrgicos	30 – 107	Teor de cobre	Correlação (+) entre teor de cobre do solo e minhoca	DAI et al. (2004)
<i>E. fetida</i>	Solo de campo e recém contaminado	15 - 67 -211-421 -829-1369	Teor de cobre, produção de casulos	Produção de casulo (-)	SCOTT-FORDSMAND et al. (2000)
<i>E. fetida</i>	Solos artificiais	1 – 115	Acumulação/ Excreção	Acumulação (+)	SPURGEON & HOPKIN (1999)
<i>E. fetida</i>	Solo de Floresta	4 - 20 - 40-80 - 160 -320	Sobrevivência, Crescimento,	Sobrevivência(-) Crescimento (-)	SVENDSEN & WEEKS (1997)
<i>L.rubellus e L.castaneus</i>	Solos do Reino Unido	22 – 816	Teor de cobre	Corelação (+) entre teor de cobre do solo e minhoca	CORP & MORGAN (1991)

* (-) Efeito de decréscimo, (+) Efeito de acréscimo

1.2 Contaminação do solo por Cobre

A aplicação de agroquímicos nas culturas é uma prática comum da agricultura, tendo como objetivo a proteção das lavouras pelo controle de doenças e pragas. Esses insumos quando utilizados de forma intensiva podem causar poluição aos solos, pois estão presentes nestes compostos, elementos potencialmente poluidores, como metais pesados, que podem provocar toxicidade as plantas, animais e seres humanos (MEURER, 2004). A adição de cobre ao solo iniciou em 1917, com o uso da calda bordalesa (BAKER, 1990) para o controle de doenças fúngicas. O seu uso continuado pode adicionar ao sistema de produção quantidades de cobre superiores ao teor crítico do solo e a capacidade máximo de adsorção (CQFSRS/SC, 2004). No solo, o cobre pode ser retido por ligações físico-químicas e sua labilidade depende do ligante, como a matéria orgânica e os óxidos ou da condição geoquímica, como por exemplo, o pH do solo (CASALI et al., 2008).

A adsorção do cobre ao solo ocorre primeiramente nos sítios de ligação mais ávidos, sendo que sua adição frequente pode aumentar a quantidade nas formas solúveis com potencial para toxidez aos ecossistemas (CASALI et al., 2008). Este metal quando presente no solo em sua forma solúvel pode ser facilmente assimilado pelos organismos através das membranas celulares, em concentrações que podem levar a toxicidade aguda e crônica.

Quando ingerido pelas minhocas, os metais que estão na superfície das partículas do solo são desorvidos e assimilados no trato digestivo do animal (ARNOLD et al., 2007), tornando as minhocas boas indicadoras da biodisponibilidade deste metal. Estudos descrevem os efeitos prejudiciais do cobre sobre comportamento, reprodução (MABOETA & FOUCHÉ, 2014), crescimento (JUBILEUS et al., 2013), atividade enzimática (BERNARD et al., 2015) e expressão de genes (BERNARD et al., 2010) na população de minhocas expostas a solos contaminados.

1.3 Minhocas *Eisenia andrei* (Bouché 1972)

As minhocas são organismos do solo pertencentes ao Domínio Eukarya, Reino Animalia, Filo Annelida, Classe Clitellata, Subclasse Oligochaeta (MADIGAN et al., 2010). Compreendem de 40% a 90% da biomassa da macrofauna dos solos tropicais (FRAGOSO et al., 1999), e são considerados organismos prestadores de serviços essenciais aos ecossistemas

(BLOUIN et al., 2013).

Muitos autores denominam esses organismos de engenheiros do solo (LAVELLE, 1988; JOUQUET et al., 2006; BROWN & DOMINGUEZ, 2010), pois contribuem para a formação e manutenção da estrutura, interferindo na oxigenação, porosidade e infiltração de água, influenciam nas propriedades químicas, através da decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes (LAVELLE, 2006; BLOUIN et al., 2013) e interferem nas relações biológicas.

Como mencionado, as minhocas têm grande influência no ambiente em que estão presentes, mas também são sensíveis a ele, podendo ser úteis na indicação de mudanças em suas propriedades. Desta forma, esses organismos são utilizados como indicadores da perturbação ambiental, da qualidade e do potencial produtivo do solo (BROWN & DOMINGUEZ, 2010). Além disso, as minhocas são um importante elo na cadeia trófica terrestre, servindo como fontes de alimento para diferentes animais, como mamíferos, anfíbios, aves e insetos (HINTON, 2002). Portanto, as minhocas podem sinalizar o estado atual dos ecossistemas bem como as mudanças ocorridas através do tempo.

Pelo seu deslocamento e ingestão do solo ou serapilheira contaminados, as minhocas entram em contato com os poluentes que estão adsorvidos nas partículas minerais, na matéria orgânica e na solução do solo (SPADOTTO et al., 2004). Neste contato, as minhocas podem se intoxicar, morrer, incorporar ou bioacumular esses poluentes em seus tecidos (CURRY, 2004).

A espécie de minhocas *Eisenia andrei* é amplamente utilizada em testes ecotoxicológicos em função do papel fundamental que desempenha na macro-fauna, pelo seu curto ciclo de vida, sua alta tolerância à umidade e temperatura e sua operação relativamente simples (DOMINGUEZ & PÉREZ-LOSADA, 2010). É a espécie padrão recomendada pelos protocolos internacionais para os testes ecotoxicológicos de substâncias químicas para regiões temperadas e tropicais.

1.4 Ecotoxicologia terrestre

A ecotoxicologia é a ciência que utiliza indicadores biológicos para prever e/ou quantificar as mudanças na qualidade do solo resultantes da poluição química persistente (BARTLETT et al., 2010), tendo como objetivo o desenvolvimento de estratégias para

interromper, reverter ou remediar esses impactos (AZEVEDO & CHASIN, 2003). Portanto, testes ecotoxicológicos permitem avaliar a toxicidade de substâncias sobre o ambiente, em função das respostas do organismo exposto (CHASIN & PEDROZO, 2004), verificado através do monitoramento de efeitos letais, morfológicos, comportamentais, fisiológicos, citogenéticos e bioquímicos (NEUHAUSER et al., 1985).

Há padrões metodológicos de ensaios de toxicidade com organismos do solo, os quais são técnicas internacionalmente reconhecidas como as da *International Organization for Standardization* (ISO) e *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) (SISINNO et al., 2004). Nestas normas estão presentes protocolos padronizados para estudos ecotoxicológicos, onde a avaliação do potencial tóxico de uma substância química no solo pode ser feita com a utilização de testes de toxicidade aguda e toxicidade crônica. O efeito agudo de um agente tóxico sobre o organismo teste é observado através da letalidade, mas outras manifestações podem ser apresentadas como diminuição na mobilidade e alterações nos aspectos biométricos relativos ao peso e crescimento (FERREIRA, 2007). O teste de toxicidade crônica avalia a resposta do organismo exposto ao poluente por um longo período de tempo (ZAGATTO et al., 1992). Normalmente apresenta-se como doses subletais que permitem a sobrevivência do organismo, porém provocam distúrbios em suas funções biológicas, tais como reprodução, maturação e desenvolvimento de ovos (GOLDSTEIN, 1988).

Os ensaios de toxicidade podem ser realizados em laboratório onde as condições experimentais são específicas e padronizadas. Estes ensaios são utilizados para estimar a toxicidade de diferentes substâncias químicas, como metais pesados, efluentes industriais, amostras ambientais (COSTA et al., 2008), lodo de esgotos (NATAL-DA-LUZ et al., 2011), resíduos e rejeitos de mineração (OLIVEIRA FILHO, 2013). O ensaio consiste em expor o organismo teste a matriz contaminada, com o objetivo de analisar se a contaminação é alta o suficiente para causar efeitos adversos sobre seu crescimento, reprodução, sobrevivência, mudanças comportamentais e metabólicas (LIMA, 2009).

No Brasil, os órgãos ambientais não exigem o emprego de testes ecotoxicológicos para avaliação da contaminação do solo, sendo utilizados somente parâmetros químicos. No entanto, a utilização de parâmetros biológicos é de fundamental importância, uma vez que tendem a ser mais sensíveis e por isso usados frequentemente para indicar a qualidade do solo (BRUSSAARD et al., 2007).

1.5 Efeitos morfológicos

O resultado dos ensaios ecotoxicológicos fornece informações sobre a toxicidade de um contaminante através da alteração no peso, reprodução e através de alterações fisiológicas e morfológicas no organismo (ANDRÉA, 2010). Buch et al. (2013) observou algumas alterações morfológicas em minhocas expostas a carbendazim. No início da exposição foi observada uma decomposição na extremidade posterior, um desanelamento dos segmentos e a presença de lesões no corpo das minhocas *Pontoscolex corethrurus*, em decorrência a exposição ao fungicida. Roberts & Dorough (1983), relataram a presença de inchaço segmentar nas minhocas *Eisenia andrei* expostas a fungicidas.

Outros estudos evidenciaram danos graves na morfologia e desenvolvimento dos espermatozoides das minhocas *Eisenia fetida* e *Eudrilus eugeniae* expostas a agrotóxicos (REINECKE et al., 1995; SOROUR & LARINK, 2001). Minhocas *Eisenia fetida* expostas a almíscares policíclicos apresentaram alterações morfológicas tais como inflamação, sangramento e excreção de fluídos (CHEN et al., 2011). Em estudos com minhocas *Eisenia andrei* expostas a doses crescentes de cobre foram verificadas ocorrência de mudanças morfológicas, tais como afinamento e descoloração da parte posterior da minhoca, estrangulamento em diferentes regiões do corpo, fragmentação e perda de segmentos (RIBEIRO et al., 2013). A observação de alterações morfológicas nos organismos expostos a contaminantes podem ser uma abordagem eficiente para avaliar a toxicidade de substância químicas.

1.6 Estresse Oxidativo

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é um processo contínuo e fisiológico, que cumpre funções biológicas relevantes, atuando como mediadores na transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas (BARBOSA et al., 2010). No entanto, quando em excesso na célula pode ser prejudicial, desencadeando um processo de estresse oxidativo, que pode causar peroxidação lipídica da membrana celular, oxidação e degradação de proteínas, enzimas e até mesmo modificar o DNA (MATÉS, 2000). As ERO incluem o íon superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH) e o oxigênio livre (O_1) (AVILEZ et al., 2008). Esses radicais podem ser formados pelo contato

dos organismos com substâncias tóxicas, ocasionando estresse oxidativo, conforme mostrado na Figura 1.

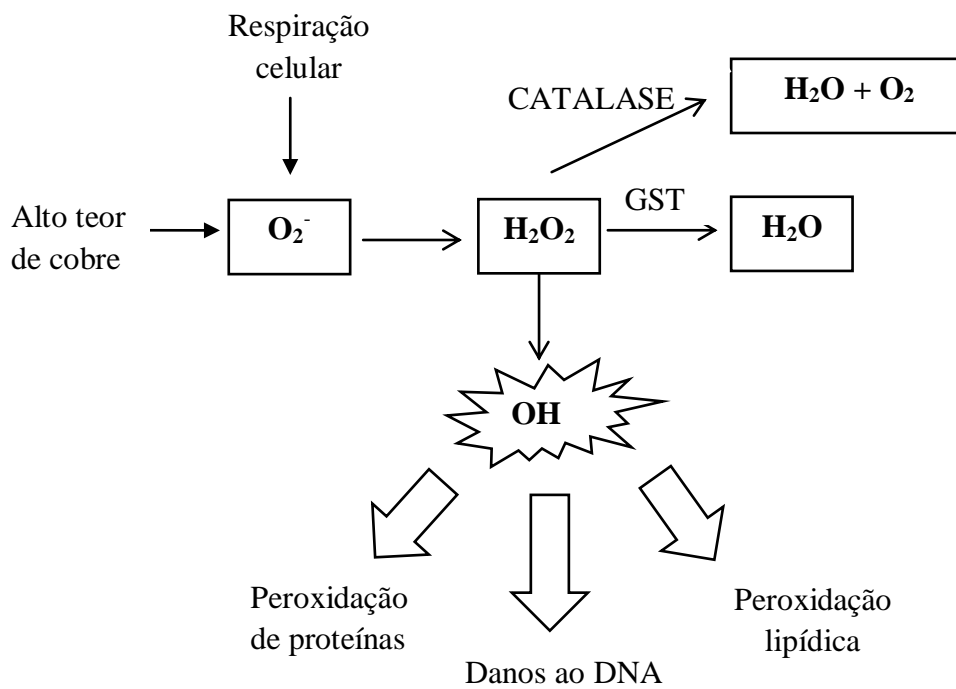


Figura 1 – Esquema da produção de radicais livres nos organismos expostos a substâncias tóxicas. Santa Maria, 2015.

Os organismos são capazes de se adaptar ao aumento das ERO através da regulação das defesas antioxidantes. Neste sistema de defesa, estão incluídas as enzimas antioxidantes tais como a catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) (GILL & TUTEJA, 2010), cuja a variação enzimática é utilizada como biomarcador em estudos ecotoxicológicos.

A glutathione S-transferase é uma proteína multifuncional envolvida nos mecanismos de defesa antioxidantes (ZHU et al., 2011), catalisa a conjugação de xenobióticos eletrofílicos e componentes oxidados com glutathione (GSH), formando produtos menos ativos, minimizando assim a toxicidade dos metais pesados (FITZPATRICK et al., 1995). O processo de conjugação é de fundamental importância toxicológica, pois a remoção de electrófilos reativos possibilita a proteção das proteínas e ácidos nucleicos (NUNES et al., 2006). Esta enzima é considerada um biomarcador de relevância em função de seu potencial de desintoxicação em organismos e por serem encontradas em todas as espécies vivas (HAYES & PULFORD, 1995).

A catalase é uma enzima de defesa antioxidante que possui a capacidade de degradar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular, protegendo desta forma as células dos efeitos tóxicos dessa substância. A enzima também oxida compostos hidrogenados como fenóis, ácido fórmico, formaldeído e alcoóis, que podem ser prejudiciais ao corpo (HACKENBERGER et al., 2012). A catalase está localizada nos peroxissomos que são organelas especializadas em consumir e produzir o H_2O_2 (VERDUYN et al., 1988). A enzima utiliza dois estágios em seu mecanismo, no primeiro estágio o ferro do grupo heme da catalase interage com o H_2O_2 formando peróxido de ferro rico em oxigênio que pode ser reduzido por uma variedade de doadores de hidrogênio. Em elevadas concentrações de H_2O_2 , o peróxido de ferro rico em oxigênio reage com uma segunda molécula de H_2O_2 produzindo água e oxigênio (SCANDALIOS, 1994). Esta enzima é amplamente utilizada como biomarcador em estudos ecotoxicológicos, por ser uma enzima que apresenta elevada atividade quando o organismo encontra-se em estresse oxidativo (AVILEZ et al., 2008).

Outra enzima utilizada como biomarcador em estudos ecotoxicológicos é a acetilcolinesterase (AChE). A atividade da enzima é essencial na transmissão dos impulsos nervosos, atuando nas sinapses colinérgicas e na junção neuromuscular (BOURAOUI et al., 2009). A acetilcolinesterase promove a hidrólise da acetilcolina (ACh), que é reconhecida como o principal desencadeador da contração muscular. Em condições normais a acetilcolina é rapidamente hidrolisada, finalizando deste modo a transmissão sináptica mediada por esse neurotransmissor (WALKER et al., 2001). A medição da atividade desta enzima é um parâmetro confiável para avaliar a ação tóxica de pesticidas (RODRÍGUEZ-CASTELLANOS

& SANCHES-HERNANDEZ, 2007; GAMBI et al., 2007) e metais pesados (VIEIRA et al., 2009; BANNI et al., 2009; BOURAOUI et al., 2009). Alguns estudos verificaram inibição na atividade da enzima em anelídeos da espécie *Hediste diversicolor* expostos a cádmio (BANNI et al., 2009), em mexilhões expostos a hidrocarboneto aromático (BANNI et al., 2010), e em minhocas *Aporrectodea caliginosa* expostas a pesticidas (BADAWY et al., 2013), evidenciando a sensibilidade da enzima utilizada como biomarcador de exposição a compostos tóxicos.

Os contaminantes presentes no ambiente podem causar estresse oxidativo nas células dos organismos expostos, através das geração de espécies reativas de oxigênio que alteram a atividade das enzimas antioxidante e o processo de desintoxicação celular, acarretando na peroxidação lipídica das membranas celulares e danos ao DNA (LIN et al., 2012). A extensão da peroxidação lipídica pode ser medido através dos níveis de TBARS- espécies reativas de ácido tiobarbitúrio, que corresponde ao malondialdeído (MDA), produto da degradação peroxidativa de lipídios das membranas (NUNES et al., 2006). Portanto os níveis de MDA são amplamente usados como marcador de estresse oxidativo em minhocas (LIN et al., 2010). Malondialdeído é o produto formado da reação entre as espécies reativas de oxigênio e os ácidos graxos insaturados da membrana celular. Eles podem reagir com as extremidades livres das proteínas, formando ligações cruzadas que podem causar lesões celulares (ZHOU et al., 2013). Como o conteúdo de MDA reflete indiretamente o grau da lesão celular, seus níveis podem ser utilizados como parâmetros sensíveis para determinar o dano oxidativo celular (CHEN et al., 2011).

Diversos autores evidenciaram o estresse oxidativo através da avaliação das flutuações das enzimas antioxidantes em minhocas expostos a diferentes agentes tóxicos, tais como pesticidas, inseticidas, metais pesados (XIONG et al., 2014; ZHOU et al., 2013; YANG et al., 2012; YU-LI et al., 2010; GAETE et al., 2010). Devido a natureza grave do dano oxidativo, as ERO são mantidas em baixos níveis nas células dos organismos, através do sistema de defesa antioxidante (BERNARD et al., 2015). Desta forma a investigação destas enzimas como biomarcadores em minhocas *Eisenia andrei* é uma boa abordagem para analisar o potencial de toxicidade ecológica do cobre. A vista do que foi exposto, o trabalho tem por objetivo determinar os efeitos (agudos, crônicos e bioquímicos) de diferentes doses de cobre em minhocas da espécie *Eisenia andrei*, conforme esquema realizado no trabalho apresentado na Figura 2.

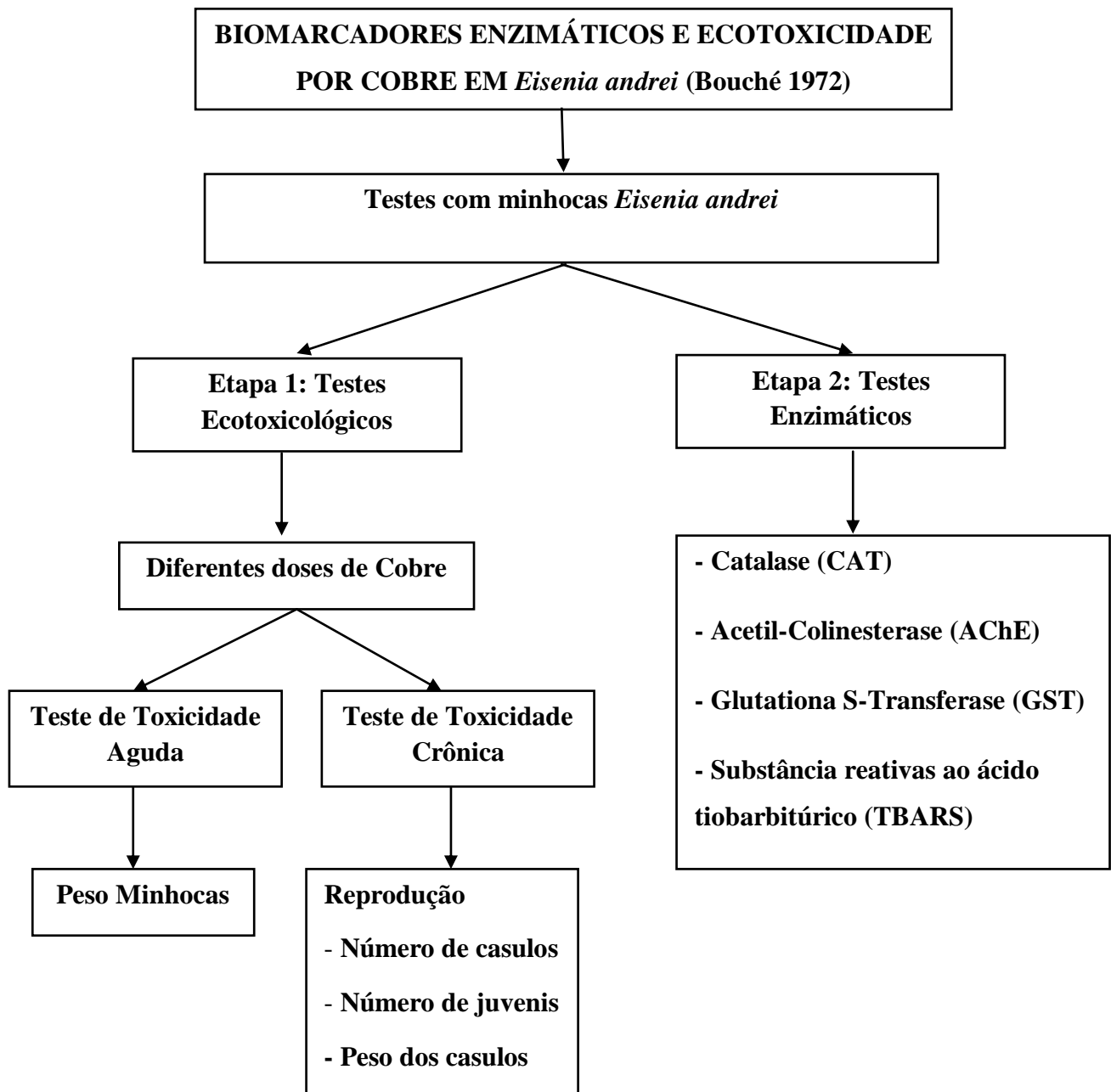


Figura 2 – Esquema do trabalho realizado sobre a ecotoxicidade de cobre em minhocas *Eisenia andrei* exposta a solos contaminados. Santa Maria, 2015.

Referências

- AMOSSÉ, J.; TURBERG, P.; KOHLER-MILLERET, R.; GOBAT, J. M.; LE BAYON, R. C. Effects of endogeic earthworms on the soil organic matter dynamics and the soil structure in urban and alluvial soil materials. **Geoderma**, v. 243-244, p. 50-57, 2015.
- ANDRÉA, M. M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. **Acta Zool. Mexicana**, v. 26, p. 95-107, 2010.
- ANTONIOLLI, Z. I. ; STEFFEN, G. P. K.; STEFFEN, R. B. Utilização de casca de arroz e esterco bovino como substrato *Eisenia fetida* Savigny (1826). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 3, p. 824-830, 2009.
- ARNOLD, R. E.; HODSON, M. E.; COMBER, S. Does speciation impact on Cu uptake by, and toxicity to, the earthworm *Eisenia fetida*? **European Journal of soil biology**, v. 43, n. 1, p. 230-232, 2007.
- ASENSIO, V.; KILLE, P.; MORGAN, A. J.; SOTO, M.; MARIGOMEZ, I. Metallothionein expression and Neutral Red uptake as biomarkers of metal exposure and effect in *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to Cd. **European Journal of Soil Biology**, v. 43, p. 233-238, 2007.
- AVILEZ, I.M.; HORI, T.S.F.; ALMEIDA, L.C.; HACKBARTH, A.; BASTOS, J.C.; BASTOS, V.L.F.C ; MORAES, G. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). **Comparative Biochemistry and physiology**, v. 148, p. 136-142, 2008.
- AZEVEDO, F. A. & CLASIN, A. A. M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos: Ed. Rima, p. 322, 2003.
- BADAWY, M. E. I.; KENAWY, A.; EL-ASWAD, A. F. Toxicity Assessment of Buprofezin, Lufenuron, and Triflumuron to the Earthworm *Aporrectodea caliginosa*. **International Journal of Zoology**, v. 1, p. 1-9, 2013.
- BAKER, D. E. Copper. In: ALLOWAY, B. J. (Ed.). Heavy metals in soils. Glasgow: Blackie and Son, 1990. p. 51-74.

- BANNI, M.; BOURAOUI, Z.; CLERANDEAU, C.; NARBONNE, J.F; BOUSSETTA, H. Mixture toxicity assessment of cadmium and benzo[a]pyrene in the sea worm *Hediste diversicolor*. **Chemosphere**, v.77, p. 902–906, 2009.
- BANNI, M.; NEGRI, A.; DAGNINI, A.; JEBALI, J.; AMEUR, S.; BOUSSETTA, H. Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus gallo provincialis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p.842–848, 2010.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v.23, p. 629-643, 2010.
- BARETTA, D.; SEGAT, J. C.; OLIVEIRA FILHO, L. C. I.; MACCARI, A. P.; SOUSA, J. P.; ROMBKE, J. Ecotoxicologia terrestre com ênfase na fauna edáfica. In: Cintia Carla Niva; George Gardner Brown. (Org.). *Ecotoxicologia Terrestre: Métodos e Aplicações dos Ensaio com Oligoquetas*. 1ed. Curitiba, PR: EMBRAPA Florestas, 2015, v. 1, p.6-36.
- BARTLETT, M. D.; BRIONES, M. J.I.; NEILSON, R.; SCHMIDT, O.; SPURGEON, D.; CREAMER, R. E. A critical review of current methods in earthworm ecology: From individuals to populations. **European Journal of Soil Biology**, v. 46, p. 67-73, 2010.
- BERNARD, F.; BRULLE, F.; DOUAY, F.; LEMIERE, S.; DEMUYNCK, S.; VANDENBULCKE, F. Metallic trace element body burdens and gene expression analysis of biomarker candidates in *Eisenia fetida*, using an “exposure/depuration” experimental scheme with field soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 5, p. 1034-1045, 2010.
- BERNARD, F.; BRULLE, F.; DUMEZ, S.; LEMIERE, S.; PLATEL, A.; NESSLANY, F.; CUNY, D.; DERAM, A.; VANDENBULCKE, F. Antioxidant responses of Annelids, Brassicaceae and Fabaceae to pollutants: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 114, p. 273-303, 2015.
- BLOUIN, M. ; HODSON, M. E.; DELGADO, E. A.; BAKER, G.; BRUSSAARD, L.; BUTT, K. R.; DAI, J.; DENDOOVEN, L.; PÉRÈS, G.; TONDOH, J. E.; CLUZEAU, D.; BRUN, J.J. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. **Eur. J. Soil Sci.**, v. 64, p. 161-182, 2013.

BOURAOU, Z.; BANNI, M.; GHEDIRA, J.; CLEARANDEAU, C.; NARBONNE, J. F.; BOUSSETTA, H. Evaluation of enzymatic biomarkers and lipoperoxidation level in *Hediste diversicolor* exposed to copper and benzo[a]pyrene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1893-1898, 2009.

BROWN, G. G. & DOMINGUEZ, J. Uso das minhocas como bioindicadoras ambientais: princípios e práticas – O 3º Encontro Latino Americano de Taxonomia de Oligoquetas (ELAETAO3). **Acta Zool. Mexicana**, v. 2, p. 1-18, 2010.

BRULLE, F.; MITTA, G.; LEROUX, R.; LEMIERE, S.; LEPRÊTRE, A.; VANDENBULCKE, F. A forte indução do gene metalotioneína, após a exposição ao cádmio afeta transitoriamente a expressão de muitos genes em *Eisenia fetida*: Um mecanismo de trade-off? **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 144, p. 334-341, 2007.

BRUN, L. A.; MAILLET, J.; RICHARTE, J.; HERRMANN, P.; REMY, J.C. Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. **Environ. Pollut.**, v. 102, p. 151-161, 1998.

BRUSSAARD, L.; RUITER, P. C.; BROWN, G. Soil biodiversity for agricultural sustainability. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 121, p.233–244, 2007.

BUCH, A. C.; BROWN, G. G.; NIVA, C. C.; SAUTTER, K. D.; SOUSA, J. P. Toxicity of three pesticides commonly used in Brazil to *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) and *Eisenia andrei*(Bouché, 1972). *Applied Soil Ecology*, v. 69, p. 32-38, 2013.

CASALI, C. A.; MOTERLE, D. F.; RHEINHEIMER, D. S.; BRUNETTO, G.; CORCINI, A. L. M.; KAMINSKI, J.; MELO, G. W. B. Formas de dessorção de cobre em solos cultivados com videira na Serra Gaúcha do Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Ciência Solo**, v. 32, n.4, p. 1479-1487, 2008.

CESAR, R. G.; COELHO, M. B.; ALVARO, T. T.; COLONESE, J. P.; CASTILHOS, Z. C.; EGLER, S. G.; BIDONE, E. D.; POLIVANOV, H.; ALEXANDRE, N. Z. Disposição continental de resíduos de mineração de carvão: drenagem ácida, ecotoxicidade aguda e biodisponibilidade de metais. **Ecotoxicol. Environ. Contam.**, v. 8, n. 2, p. 17-22, 2013.

CHEN, C.; ZHOU, Q.; LIU, S.; XIU, Z. Acute toxicity, biochemical and gene expression responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks. **Chemosphere**, v. 83, p. 1147–1154, 2011.

CLASIN, A. A. M. & PEDROZO, M. F. M. O estudo da toxicologia. In: As bases toxicológicas da ecotoxicologia. Azevedo FA & Clasin AAM (Eds.) Rima/InterTox, São Carlos/São Paulo, p. 340, 2004.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - CQFSRS/SC. Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. 10.ed. Porto Alegre, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400p.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA n.420, de 28 de janeiro de 2009. Brasília, 16p.

CORP, N. & MORGAN, A. J. Accumulation of heavy metals from polluted soils by the earthworm, *Lumbricus rubellus*: can laboratory exposure of 'control' worms reduce biomonitoring problems? **Environ. Pollut.**, v. 74, p. 39–52, 1991.

COSTA, C. R.; OLIVEIRA, P.; BOTTA, C. R. M.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, p. 1820-1830, 2008.

CURRY, J. P. Factors affecting the abundance of earthworms in soils. **Earthworm ecology**, v. 2, p. 91-113, 2004.

DAI, J.; BECQUER, T.; ROUILLER, J. H.; REVERSAT, G.; REVERSAT, F. B.; NAHMANI, J.; LAVELLE, P. Heavy metal accumulation by two earthworm species and its relationship to total and DTPA-extractable metals in soils. **Soil Biol. Biochem.**, v. 36, p. 91-98, 2004.

DOMÍNGUEZ, J. & PÉREZ-LOSADA, M. Eisenia fetida (Savigny, 1826) y Eisenia andrei Bouché, 1972 son dos espécies diferentes de lombrices de tierra. **Acta zoológica mexicana**, v. 26, n. 2, p. 321-331, 2010.

DORAN, J. W. & ZEISS, M. R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 3-11, 2000.

FITZPATRICK, P. J.; SHEEHAN, D.; LIVINGSTONE, D. R. Studies on iso enzymes of glutathione S-transferase in the digestive gland of *Mytilus gallo provincialis* with exposure topollution. **Mar. Environ**, v.39,p.241–244, 1995.

FIUZA, D. T. F.; KUSDRA, J. F.; FIUZA, S. S. Crescimento do milho em solo sob atividade de *Chibui Bari* (Oligochaeta: Glossoscolecidae). **Rev. Bras. Ciência do Solo**, v. 36, n. 2, p. 359-366, 2012.

FOUNTAIN, M. T.; HOPKIN, S. P. *Folsomia candida* (Collembola): A “Standard” Soil Arthropod. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 201-22, 2005.

FRAGOSO, C.; LAVELLE, P.; BLANCHART, E.; SENAPATI, B. K.; JIMÉNEZ, J. J.; MARTÍNEZ, M. A.; DECAENS, T. & TONDOH, J. 1999. Earthworm communities of tropical agroecosystems: origin, structure and influence of management practices. Pp. 27–55. In: P. Lavelle, L. Brussaard and P.F. Hendrix (Eds). *Earthworm management in tropical agroecosystems*. CABI, Wallingford.

GAETE, H.; HIDALGO, M. E.; NEAMAM, A.; ÁVILA, G. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE COBRE EN SUELOS A TRAVÉS DE BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN *Eisenia foetida*. **Quim. Nova**, v. 33, p. 566-570, 2010.

GAMBI, N.; PASTERIS, A.; FABBRI, E. Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 145, p. 678–685, 2007.

GARCIA, M.; ROMBKE, J.; BRITO, M. T.; SCHEFFCZYK, A. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. **Environmental Pollution.**, v. 153, n. 2, p. 450-456, 2008.

GILL, S.S. & TUTEJA, N. Espécies reativas de oxigênio e máquinas antioxidante em tolerância ao estresse abiótico em plantas cultivadas. **Plant Physiol. Biochem.**, v.48, p. 909-930, 2010.

GIROTTI, E.; CERETTA, C. A; BRUNETTO, G.; MIOTTO, A.; TIECHER, T. L.; DE CONTI, L.; LORENSINI, F.; GUBIANI, P. I.; SILVA, L. S.; NICOLODO, F. T. Copper availability assessment of Cu-contaminated vineyard soils using Black oat cultivation and chemical extractants. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 186, p. 9051-9063, 2014.

GOLDSTEIN, E. G. Testes de toxicidade de efluentes industriais. In: *Ambiente*, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 33-38, 1988.

HACKENBERGER, B. K.; VELKI, M.; STEPIC, S.; HACKENBERGER, D. K. O efeito da formalina sobre as actividades da acetilcolinesterase e catalase, e na concentração de oximas,

- nas espécies de minhocas *Eisenia andrei*. **European Journal of Soil Biology**, v. 50, p. 137-143, 2012.
- HAYES, J.D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Rev Biochem Mol Biol.**, v.30, p.445-600, 1995.
- JOUQUET, P.; DAUBER, J.; LAGERLOF, J.; LAVELLE, P. & LEPAGE, M. Soil invertebrates as ecosystem engineers: Intended and accidental effects on soil and feedback loops. **Appl. Soil Ecol.**, v. 32, p.153-164, 2006.
- JUBILEUS, M. T.; THERON, P. D.; VAN RENSBURG, L.; MABOETA, M. S. Utilizing *Eisenia andrei* to assess the ecotoxicity of platinum mine tailings disposal facilities. **Ecotoxicology**, v. 22, p.331-338, 2013.
- LASZCZYCA, P.; AUGUSTYNIAK, M.; BABCZYNSKA, A.; BEDNARSKA, K.; KAFEL, A.; MIGULA, P. Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland). **Environment International**, v. 30, p. 901-910, 2004.
- LAVELLE, P. Earthworm activities and the soil system. **Biology and Fertility of Soils**, v. 6, n.3, p. 237-251, 1988.
- LAVELLE, P.; DECAENS, T; AUBERT, M.; BAROT, S.; BLOUIN, M.; BUREAU, F.; MARGERIE, P.; MORA, P.; ROSSIC, J. P. Soil invertebrates and ecosystem services. **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p. 3-15, 2006.
- LIJTEROFF, R.; LIMA, L.; PRIERI, B. Uso de líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica em la ciudad de San Luis, Argentina. **Rev. Int. Contam. Ambient.**, v. 25, n. 2, p. 111-120, 2009.
- LIMA, C. A. **Avaliação de risco ambiental como ferramenta para o descomissionamento de uma indústria de metalurgia de zinco**. 2009.238 f. (Tese de Doutorado)-Universidade federal do Rio de Janeiro, 2009.
- LIN, D.; ZHOU, Q.; XIE, X.; LIU, Y. Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*). **Chemosphere**, v.81, p. 1328–1333, 2010.
- LIN, D.S.; XIE, X.J.; ZHOU, Q.X.; LIU, Y. Biochemical and genotoxic effect of triclosan on earthworms (*Eisenia fetida*) using contact and soil tests. **Environ. Toxicol.**, v. 27, p. 385–392, 2012.

- MA, W. C. Critical body residues (CBRs) for ecotoxicological soil quality assessment: copper in earthworms. **Soil Biol. Biochem.**, v. 37, p. 561-568, 2005.
- MABOETA, M.; FOUCHÉ, T. Utilizing an Earthworm Bioassay (*Eisenia andrei*) to Assess a South African Soil Screening Value with Regards to Effects from a Copper Manufacturing Industry. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, n. 3, p. 322-326, 2014.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Microbiologia de Brock. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.
- MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzyme in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000.
- MEURER, E. J. **Fundamentos de Química do Solo**. Porto Alegre, 2012. 280 p.
- MIOTTO, A.; CERETTA, C. A.; BRUNETTO, G.; NICOLOSO, F. T.; GIROTTO, E.; FARIAS, J.G.; TIECHER, T.L.; DE CONTI, L.; TRENTIN, G. Copper uptake, accumulation and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil. **Plant and Soil**, v. 374, p. 593-610, 2014.
- NATAL-DA-LUZ, T.; OJEDA, G.; PRATAS, J.; VAN GESTEL, C. A. M.; SOUSA, J. P. Toxicity to *Eisenia andrei* and *Folsomia candida* of a metal mixture applied to soil directly or via an organic matrix. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, p. 1715-1720, 2011.
- NEUHAUSER, E. F.; LOEHR, R. C.; MILLIGAN, D. L.; MALECKI, M. R. Toxicity of metals to the earthworms *Eisenia fetida*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 1, p. 149-152, 1985.
- NUNES, B.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. **Chemosphere**, v. 62, p. 581 – 594, 2006.
- OLIVEIRA FILHO, L. C. I. **Análise de risco ecológico e mesofauna em áreas de mineração**. 2013. 159 f. Tese (Doutorado em Manejo do Solo)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias. Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages, SC, 2013.

OLIVEIRA, M. A.; GOMES, C. F. F.; PIRES, E. M.; MARINHO, C. G. S.; DELLA LUCIA, T. M. C. Bioindicadores ambientais: insetos como um instrumento desta avaliação. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 61, p. 800-807, 2014.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guia para testes Químicos, OECD 207. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 1984.

ROBERTS, B.L.; DOROUGH, H.W. Chemical induction of midsegmental swelling in earthworms: structure-activity relationship (Abstract). Presented at the Fourth Annual Meeting, Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Arlington, VA, 6-9 November, 1983.

RODRÍGUEZ-CASTELLANOS, L. & SANCHES-HERNANDEZ, J. C. Earthworm biomarkers of pesticide contamination: Current status and perspectives. **Journal of Pesticide Science**, v. 32, p. 360–371, 2007.

SCANDALIOS, J.G. Regulation and properties of plant catalases. In: FOYER, C.H.; MULLINEAUX, P. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.275-315.

SCOTT-FORDSMAND, J. J.; WEEKS, J. M.; HOPKIN, S. P. Importance of contamination history for understanding toxicity of copper to earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta: Annelida), using neutral-red retention assay. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.19, p. 1174-1780, 2000.

SISINNO, C.; BULUS, M.; RIZZO, A.; SÁFADI, R.; FONTES, A.; MOREIRA, J. Ensaios ecotoxicológicos como um instrumento de complementação da avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares em áreas contaminadas por hidrocarbonetos, pp. 150-154. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE SAÚDE A AMBIENTE, 3., 2004, Rio de Janeiro. Anais.Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2004. 164p.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Embrapa Meio Ambiente, Documentos No. 42. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 2004.

SPURGEON, D. J & HOPKIN, S. Effects of metal-contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference reference to zinc. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 35, p. 86-95, 1996.

SPURGEON, D. J. & HOPKIN, S. P. Comparisons of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils. **Appl. Soil Ecol.**, v.11, p. 227–243, 1999.

SVENDSEN, C. & WEEKS, J. M. Relevance and applicability of a simple earthworm biomarker of copper exposure. I. Links to ecological effects in a laboratory stud with *Eisenia andrei*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 36, p. 72–79, 1997.

VERDUYN, C.; GIUSEPPIN, M. L. F.; SCHEFFERS, A.; VAN DIJKEN, J. P. Hydrogen peroxide metabolism in yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2086-2090, 1988.

VIEIRA, L.R.; GRAVATO, C.; SOARES, A.M.V.M.; MORGADO, F.; GUILHERMINO, L. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behavior. **Chemosphere**, v. 76, p. 1416–1427, 2009.

WALKER, C.H. HOPKIN, S.P. (2001). **Principles of ecotoxicology**. Taylor & Francis Publishers. London.

WU, S.; ZHANG, H.; ZHAO, S.; WANG, J.; LI, H.; CHEN, J. Respostas de biomarcadores de minhocas (*Eisenia fetida*) expostas para fenantreno e pireno tanto individualmente como combinados em microcosmos. **Chemosphere**, v. 87, n. 4, p. 285-293, 2012.

XIONG, W.; DING, X.; ZHANG, Y.; SUN, Y. Ecotoxicological effects of a veterinary food additive, copper sulphate, on antioxidant enzymes and mRNA expression in earthworms. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, p. 134-140, 2014.

YANG, X.; SONG, Y.; KAI, J.; CAO, X. Enzymatic biomarkers of earthworms *Eisenia fetida* in response to individual and combined cadmium and pyrene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 86, p.162–167, 2012.

YU-LI, X.; LUO, Y.; YUN, M.; WANG, J.; WANG, J. Effects of 1-methyl-3-octylimidazolium bromide on the anti-oxidant system of earthworm. **Chemosphere**, v. 78, p. 853-858, 2010.

YVAN, C.; STÉPHANE, S.; STÉPHANE, C.; PIERRE, B.; GUY, R.; HUBERT, B. Role of earthworms in regenerating soil structure after compaction in reduced tillage systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 55, p. 93-103, 2012.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E.; GOLDSTEIN, E. G.; SOUZA, H. B. Avaliação de toxicidade em sistemas de tratamento biológico de afluentes líquidos. In: Revista DAE, São Paulo, v. 52, n. 166, p. 01-06, 1992.

ZHOU, C.F.; WANG, Y; LI, C. C.; SUN, R.J.; YU, Y.; ZHOU, D. Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (*Eisenia fetida*). **Environmental Pollution**, v. 180, p. 71-77, 2013.

ZHU, J.; LU, Y.; CHEN, W. Single and joint toxic effects of cadmium and phenanthrene on enchytraeid *Fridericia bulbosa*. **European Journal of Soil Biology**, v. 44, n. 3, p. 260-265, 2008.

2 ARTIGO I- Respostas ecotoxicológicas de *Eisenia andrei* ao cobre¹

2.1 Resumo

A aplicação de agrotóxicos nas culturas é uma prática comum da agricultura tendo como objetivo a proteção de controle de pragas e doenças. Um dos insumos agrícolas mais conhecidos é a calda bordalesa. Este fungicida, quando utilizado intensamente, resulta em uma adição considerável de cobre ao solo. Para avaliar o potencial de toxicidade e os efeitos de uma substância aplicada no ambiente são utilizados testes ecotoxicológicos, com normas padronizadas pela *International Standard Organization* (ISO) e *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD). O presente estudo teve como objetivo determinar os efeitos toxicológicos do cobre na espécie de minhoca *Eisenia andrei*. Utilizou-se as doses de cobre de, 0, 35, 70, 105, 140 e 175 mg.Kg⁻¹, aplicadas ao solo, na avaliação da biomassa e reprodução das minhocas, através dos testes ecotoxicológicos. Os resultados evidenciaram que as maiores doses de cobre testadas (140 e 175 mg.Kg⁻¹) foram tóxicas, pois as minhocas apresentaram redução média na biomassa e no número de casulos. Entretanto, não foi observada diferença significativa em relação ao peso médio dos casulos e a média de juvenis por casulo nas diferentes doses de cobre. As alterações significativas observadas nos testes indicam que as maiores doses de cobre causam efeito prejudicial sobre as minhocas.

Palavras-chave: ecotoxicologia, *Eisenia andrei*, cobre, biomassa, reprodução

¹ Artigo elaborado de acordo com as normas da Revista Agronomica.

2.2 INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado e sem orientação profissional de insumos agrícolas contribuem para o aumento da poluição ambiental, em função da liberação de produtos químicos considerados tóxicos para a fauna, flora e a saúde humana (ROSOLEN, 2015). Dentre estes compostos químicos utilizados na agricultura, destaca-se a calda bordalesa, um fungicida amplamente utilizado no controle do míldio em videiras. A intensa utilização deste produto a base de cobre resulta em uma adição considerável do metal ao solo, aumentando o potencial de toxicidade e contaminação ao ambiente (MIOTTO et al., 2014).

O efeito das substâncias químicas aplicadas ao solo podem ser avaliadas através de testes ecotoxicológicos, pois estes permitem compreender e prever os efeitos destas substâncias sobre as comunidades naturais em condições realistas (CHAPMAN, 2002). A ecotoxicologia utiliza indicadores biológicos para prever e/ou quantificar as mudanças na qualidade do solo (BARTLETT et al., 2010), tendo como objetivo o desenvolvimento de estratégias para interromper, reverter ou remediar esses impactos (AZEVEDO & CHASIN, 2003).

É crescente o número de trabalhos que utilizam minhocas em testes ecotoxicológicos (SVENDSEN & WEEKS, 1997; SPURGEON & HOPKIN, 1999; MA, 2005; JUBILEUS et al., 2013; MABOETA & FOUCHÉ, 2014), em função desses organismos serem altamente influenciados pela contaminação do solo, pois ao ingerir resíduos destas substâncias durante sua alimentação podem se intoxicar, incorporar e até bioacumular esses poluentes em seus tecidos (CURRY, 2004). As minhocas podem ainda absorver os contaminantes da solução do solo por meio de contato direto e passagem pela cutícula (BROWN & DOMÍNGUEZ, 2010). Esta intoxicação é de grande preocupação haja vista a importância destes animais na manutenção da estrutura do solo (BOTTINELLI et al., 2015), fertilidade (BROWN & DOMÍNGUEZ, 2010), melhoramento da porosidade, infiltração e retenção da água (FIUZA,

2012) e na decomposição de resíduos (ANTONIOLLI, 2009).

As minhocas são também consideradas excelentes bioindicadores em teste ecotoxicológicos, em função do seu hábito alimentar, comportamento e por serem susceptíveis à perturbação e contaminação do hábitat em que vivem (DOMINGUEZ & PÉREZ-LOSADA, 2010). A presença de metais no solo influencia as minhocas podendo ocasionar mortalidade (SPURGEON e HOPKINS, 1995; SPURGEON et al., 2000), redução de seu crescimento (VAN GESTEL et al., 1991; KHALIL et al., 1996), diminuição na fertilidade (SIEKIERSKA & URBANSKA-JASIK, 2002), redução na produção de casulos e na viabilidade dos casulos (MA, 1988; SPURGEON e HOPKINS, 1996). Estas alterações observadas no organismo são utilizadas como indicativos de contaminação em ensaios ecotoxicológicos.

O objetivo do presente estudo foi determinar os efeitos toxicológicos das diferentes doses de cobre na biomassa e reprodução das minhocas *Eisenia andrei*, através dos testes de toxicidade aguda e crônica.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Solo utilizado

O solo utilizado para os testes ecotoxicológicos foram coletados na camada de 0-20 cm da área de campo da UFSM sem histórico de uso agrícola. O solo foi seco ao ar, destorroado e peneirado com peneira de malha 2 mm, para separação de fragmentos vegetais e outros resíduos.

Os solos contaminados com as diferentes doses de cobre foram enviados para determinação química no Laboratório de análise de solos da UFSM, Tabela 1.

Tabela 1: Resultado da análise química do solo após a adição das diferentes doses de cobre.

	Doses de cobre aplicadas ao solo (mg.Kg⁻¹)					
	0	35	70	105	145	175
Disponibilidade do cobre no solo Mehlich-1 (mg/dm³)	0,4	12,1	19,6	26,4	37,2	54,5

O solo coletado apresenta as seguintes características: pH em água 5,6; matéria orgânica 1,2%; Argila 26%, CTC 12,9; P 18 mg/L; K 40 mg/L; Ca 6,9 cmol/L; Mg 3,3 cmol/L; H+Al 2,5 cmol/L; Cu 0,4 mg/L; Zn 1,7 mg/L.

2.3.2 Testes ecotoxicológicos

Para o teste de toxicidade aguda (teste de mortalidade) e o teste de toxicidade crônica (teste de reprodução) utilizou-se minhocas *Eisenia andrei* como bioindicadores da contaminação por cobre. Os testes foram realizados no laboratório de Biologia do Solo e Ambiente, da Universidade Federal de Santa Maria.

2.3.3 Teste de Toxicidade Aguda com solo contaminado

O teste de toxicidade aguda foi baseada na orientação da “*Organization for Economic Co-operation and Development (OECD)*”- Guia para testes químicos nº 207 (OECD-1984), usando solo natural no lugar do solo artificial. O ensaio utilizou diferentes doses de cobre, (0, 35, 70, 105, 140, 175 mg.Kg⁻¹), aplicados ao solo na forma líquida, utilizando-se uma solução de sulfato de cobre. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos, com três repetições. O parâmetro de avaliação utilizado foi o aspecto biométrico da minhoca, já que todas as doses utilizadas são consideradas subletais,

abaixo da CL_{50} (519 $mg.Kg^{-1}$ para cobre), relatado para *E. fetida* em solo artificial OCDE (HONEYCUTT et al., 1995 e SPURGEON et al., 1994). As minhocas utilizadas nesse ensaio foram indivíduos adultos clitelados oriundos do minhocário do Departamento de Solos - UFSM.

A montagem do ensaio consistiu em adicionar 500 gramas de solo contaminado com as diferentes doses de cobre nos recipientes com capacidade de 1L, formando uma lâmina de solo de 5 cm. A umidade do solo foi mantida em 60% da capacidade de campo. Para cada unidade experimental foi adicionado esterco bovino seco, e em seguida as minhocas previamente pesadas, com massa variando entre 250 e 600 mg cada indivíduo conforme recomendado pela OECD. Os recipientes foram acondicionados em BOD com temperatura constante de 20°C. A pesagem das minhocas foi realizada no sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dia após instalação do experimento.

2.3.4 Análise estatística

No teste de toxicidade aguda, para as variações na biomassa das minhocas, aos 21 dias, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. As análises foram executadas através do software Assistat (SILVA & AZEVEDO, 2009).

2.3.5 Teste de Toxicidade Crônica em solo contaminado

No experimento avaliou-se a dose de cobre com potencial para interferir na reprodução das minhocas. As minhocas usadas no ensaio foram sincronizadas, inicialmente foi feito a coleta de minhocas juvenis, sem clitelo, no minhocário do Departamento de Solos da UFSM. Estas minhocas foram colocadas individualmente em placas de Petri contendo solo

e esterco bovino como alimento. Foram feitos furos na tampa das placas para permitir as trocas gasosas. Posteriormente as placas foram acondicionadas em uma BOD onde permanecem até as minhocas atingirem a fase adulta (clitelo desenvolvido).

O ensaio de toxicidade crônica seguiu a orientação do *International Standard Organization* - ISO 11268-1 - Efeitos de poluentes em minhocas, determinação do efeito na reprodução (ISO 1997). No ensaio foram testados os solos contaminados com as mesmas doses de cobre que no teste de toxicidade aguda, (0, 35, 70, 105, 140, 175 mg.Kg⁻¹ Cu).

A montagem do ensaio consistiu em adicionar 500 gramas de solo contaminado com as diferentes doses de cobre, em recipientes com capacidade de 1L, formando uma lâmina de solo de 5 cm. A umidade do solo foi mantida em 60% da capacidade de campo. Para cada unidade experimental foi adicionado esterco bovino seco, e em seguida foram pesadas 10 minhocas e alocadas em cada unidade experimental. O peso inicial das minhocas variou de 250 a 600 mg. Antes de adicionar as minhocas, estas foram colocadas em placas de Petri com filtro de papel molhado durante um período de 24 h, para depurar seus conteúdos estomacais.

Os recipientes foram fechados com tecido não tecido (TNT), para limitar a perda de umidade do substrato e evitar a fuga das minhocas. Os recipientes foram acondicionados em uma BOD com temperatura de 20°C e semanalmente foi adicionado esterco bovino ao longo do período de 28 dias.

No final deste período as minhocas foram removidas, e os casulos deixados nos solos contaminados durante um período de 56 dias. Após este período, o número de casulos, bem como os juvenis foram contados. O ensaio seguiu o delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos, com três repetições para cada tratamento.

2.3.6 Análise estatística

No teste de toxicidade crônica, para o número de casulos e juvenis por casulos, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. As análises foram executadas através do software Assistat (SILVA & AZEVEDO, 2009).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Teste de Toxicidade Aguda

No teste de toxicidade aguda foi avaliada a biomassa média das minhocas expostas ao solo contaminado com diferentes doses de cobre (Tabela 2). Durante os 21 dias de ensaio não foi observado nenhuma mortalidade.

Tabela 2: Biomassa média (g) de minhocas expostas a solos contaminados com diferentes doses de cobre durante um período de 21 dias do bioensaio, em condições controladas.

Dias	Doses (mg.Kg ⁻¹ Cu)					
	0	35	70	105	140	175
0	0,276 cA	0,253 dA	0,255 cA	0,286 cA	0,273 bA	0,260 aA
7	0,336 bA	0,316 cA	0,296 cA	0,333 bA	0,316 aA	0,300 aA
14	0,356 bA	0,346 bA	0,357 bA	0,360 aA	0,336 aA	0,276 aB
21	0,410 aA	0,403 aA	0,413 Aa	0,400 aA	0,353 aB	0,226 bC

*Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

No primeiro dia, início do ensaio, não houve diferença significativa (p>0,05) entre as minhocas expostas aos solos contaminados e o controle. Com o passar dos dias, houve uma tendência de aumento na biomassa das minhocas *Eisenia andrei* até a dose de 140 mg.Kg⁻¹

Cu. Este resultado apresenta similaridade com os ensaios de Svendsen & Weeks (1997), onde foi possível verificar que nas concentrações de cobre de até 80 mg/Kg^{-1} não foi observado inibição no crescimento médio de minhocas *E. andrei*. No entanto nos ensaios realizados com *Eisenia andrei* em laboratório de Maboeta & Fouché (2014), apenas minhocas expostas ao solo sem adição de cobre apresentaram aumento significativo de biomassa, enquanto que as minhocas presentes em concentrações de $39,17 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de Cu, aos sete dias de exposição, já apresentaram redução na biomassa.

As possíveis razões das variações na dose de cobre que causam toxicidade às minhocas relatada por diferentes autores podem ser em função da espécie utilizada no teste, no tempo de contato e nas características de cada solo (ANDRÉA, 2010; JUBILEUS et al., 2013; MABOETA & FOUCHÉ, 2014). As propriedades do solo exercem grandes influências sobre a absorção e toxicidade dos metais pesados para as minhocas, pois características físico-químicas, tais como pH, teor de argila, porcentagem de matéria orgânica, influenciam diretamente no comportamento e na biodisponibilidade do cobre (SPADOTTO et al., 2004). Como os testes foram conduzidos em solos coletados a campo, os resultados da toxicidade do cobre nas minhocas é ambientalmente mais realista do que estudos de toxicidade realizado com solo artificial.

As minhocas são consideradas acumuladoras eficazes de metal do solo, levando ao armazenamento ou excreção dos íons a partir de seus tecidos (LUKKARI et al., 2005). Estes apresentam a capacidade de redistribuir os metais em seu corpo, especialmente o cobre, metal essencial, levando o equilíbrio entre a absorção e excreção (HOPKINS, 1989). No entanto em altas concentrações ocorre um desequilíbrio entre absorção e excreção, causando toxicidade ao organismo. Esta toxicidade pode ser observada nas minhocas expostas ao solo contaminado com a dose de 175 mg.Kg^{-1} de Cu, que apresentaram uma significativa redução média na biomassa em relação as demais doses a partir dos quatorze dias de exposição,

seguindo até os vinte um dias, final do ensaio, (Tabela 2). Este resultado esta de acordo com os ensaios de Svendsen & Weeks (1997), onde verificaram que nas concentrações mais elevadas de cobre no solo (160 e 320 mg.Kg⁻¹) as minhocas *Eisenia andrei* começaram a perder peso corporal.

Aos vinte um dias de exposição, as minhocas presentes no solo contaminado com a dose de 140 mg.Kg⁻¹Cu apresentaram menor peso corporal em relação as demais minhocas presentes nas diferentes doses, exceto a dose de 175 mg.Kg⁻¹ que apresentou redução acentuada na biomassa. Este resultado apresenta similaridade com os ensaios de Maboeta et al. (2004), onde se verificou que na concentração de 121,37 mg.Kg⁻¹ a minhoca *E. fetida* apresentou redução média em sua biomassa. Segundo Heckmann et al. (2010), o perigo de toxicidade pode aumentar com o tempo de exposição.

As perdas de peso evidenciadas no presente estudo podem indicar o estresse que as minhocas sofrem sob as diferentes concentrações de cobre. O cobre é considerado um metal essencial para a maioria dos organismos, no entanto a diferença entre deficiência e a toxicidade é muito baixa, em especial para organismos como as minhocas, que não apresentam barreiras efetivas para a absorção controlada (DOULL & KLAASSEN, 1980). Apesar dos solos apresentarem diferentes características físicas que influenciam na disponibilidade dos metais, os testes ecotoxicológicos fornecem informações sobre quais concentrações de metais que causam redução na população de minhocas (NAHMANI et al., 2007).

As alterações na biomassa são consideradas parâmetros mais sensíveis do que a sobrevivência (MABOETA et al., 2004), pois em testes de toxicidade aguda onde é avaliada a concentração de cobre que causa letalidade em 50% dos indivíduos expostos (CL₅₀), Lukkari et al. (2005) encontrou valores de 249 mg.Kg⁻¹ Cu para *Aporrectodea tuberculata*; Honeycutt et al. (1995) e Spurgeon et al. (1994) relataram para *Lumbricus rubellus*, CL₅₀ 519 mg.Kg⁻¹;

Neuhauser et al. (1985) encontraram valores de CL_{50} 643 mg.Kg^{-1} para *Eisenia fetida*. Estas doses de cobre que causam letalidade são maiores que as doses onde já é possível observar redução na biomassa das minhocas. Populações de minhocas com histórico de exposição a solos contaminados com metais a longos períodos de tempo são menos influenciadas em altos teores de metais do que minhocas recém expostas (LUKKARI et al., 2005).

Ao final do experimento as minhocas presentes no solo controle, sem adição de cobre, apresentaram um incremento de biomassa no valor de 48,17% em relação ao início do ensaio, já nas doses de 35, 70, 105 e 140 mg.Kg^{-1} o incremento foi de 59,21; 63,16; 39,51 e 29,27%, respectivamente. No controle, solo sem adição de cobre, o incremento de biomassa foi menor que nas doses de 35 e 70 mg.Kg^{-1} Cu. Esse menor incremento pode ser explicado pela deficiência desse oligoelemento essencial, com papel importante no transporte de substâncias em células e tecidos. Resultado semelhante foi relatado nos ensaios de Lukkari et al. (2005), onde se observou uma redução na biomassa das minhocas no controle, em decorrência de uma deficiência do metal.

A redução na biomassa das minhocas pode ser utilizada como critério de validação do teste, pois nas doses mais altas de cobre foi observado perda de peso significativa indicando efeito subletal. A longo prazo, estes efeitos subletais podem levar a redução na densidade populacional de minhocas *E. andrei*.

2.4.2 Teste de Toxicidade Crônica

O sucesso reprodutivo foi avaliado através da contagem do número de casulos e juvenis e do peso dos casulos após os 56 dias do teste, (Tabela 3). Não foram observadas diferenças significativas entre o número médio de casulos produzido pelas minhocas expostas nas doses de 35; 70 e 105 mg.Kg^{-1} de cobre em relação ao controle. Porém nos solos

contaminados com as maiores doses de cobre, 140 e 175 mg.Kg⁻¹ foi verificada uma redução significativa na produção de casulos.

TABELA 3: Parâmetros reprodutivos médios de *Eisenia andrei* expostas a solos com diferentes níveis de cobre, após 56 dias em condições controladas de temperatura e umidade.

Teor de Cu (mg.Kg ⁻¹ Cu)	Número médio de casulos	Peso médio de casulos	Média juvenis/casulos
0	75,66 a	0,0173 ^{NS}	1,20 ^{NS}
35	67,34 a	0,0156	1,29
70	75,32 a	0,0155	1,30
105	72,37 a	0,0182	1,18
140	50,33 b	0,0188	1,29
175	47,65 b	0,0185	1,35

* Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

Estudos anteriores apresentaram similaridade com o resultado atual, indicando a ocorrência de redução na produção de casulos na dose de 159 mg.Kg⁻¹ Cu (SPURGEON & HOPKIN, 1996). Já outros autores (LUKKARI et al., 2005; SVENDSEN & WEEKS, 1997), trabalhando com doses similares de Cu (119 e 160 mg/Kg⁻¹) evidenciaram que minhocas *Aporrectodea tuberculata* e *Eisenia andrei* não produziram casulos. As possíveis causas para redução na produção de casulos se deve ao gasto de energia disponibilizado pela minhoca para resistir ao contaminante, através da remoção (DONKER et al.,1993). Esta exigência de energia adicional vai reduzir a energia disponível para o crescimento, diferenciação e produção de casulo (DONKER et al., 1993). Além disso, as minhocas expostas a solos contaminados podem apresentar retardo na maturação sexual e por consequência uma redução na produção de casulos (SPURGEON & HOPKIN,1996).

A produção de casulos é o parâmetro avaliado com maior sensibilidade em testes ecotoxicológicos, pois apresenta redução na produção média em concentrações crescentes do metal (SPURGEON & HOPKINS, 1996; SCOTT-FORDSMAND et al., 2000; LUKKARI et

al., 2005; MABOETA & FOUCHÉ, 2014). No entanto, em alguns testes foi observado que em concentrações mais baixas de metais no solo, a produção foi maior, embora a viabilidade do casulo tenha sido alterada (REINECKE et al., 1997; PHILIPS & BOLGER, 1998).

No estudo atual, apenas efeitos negativos foram observados nas doses mais altas em relação a produção de casulos. Este resultado indica que as maiores doses de cobre utilizadas no teste interferiram negativamente nos parâmetros reprodutivos das minhocas *E. andrei*. A maior presença do metal pesado que pode interferir na produção de gametas, fertilização e desenvolvimento embrionário (REINACKE et al., 2001). Além disso, a redução na taxa de crescimento, como observado no teste de toxicidade aguda, ocorrido nas maiores doses de cobre, tem influência nos parâmetros reprodutivos da minhoca, ocasionando atraso na maturação (KLOK & DE ROSS, 1998).

O número de juvenis foi dependente do número de casulos produzidos, refletindo o mesmo padrão em relação as doses de cobre tal como descrito para os casulos. Não foi observado, no entanto, nenhum efeito significativo ($p > 0,05$) no sucesso de eclosão (número de juvenis/número de casulos) e no peso médio dos casulos das diferentes doses de cobre, (Tabela 3). No presente estudo verificou-se que a biomassa e a reprodução podem servir de parâmetros sensíveis de toxicidade do cobre em minhocas *Eisenia andrei*.

2.5 Conclusões

- Os resultados obtidos para os testes de toxicidade aguda e crônica indicam que nas concentrações mais altas de cobre houve uma redução na biomassa e na produção de casulos das minhocas *Eisenia andrei*. Como nos testes foram utilizados os mesmos solos, e portanto as mesmas características, as diferenças encontradas na biomassa e reprodução das minhocas são atribuídas as diferentes doses de cobre aplicadas ao solo. Desta forma deve-se considerar

que o uso intensivo de agrotóxicos a base de cobre e suas cargas crescentes no solo podem resultar em potenciais riscos ecológicos para a macrofauna terrestre.

REFERÊNCIAS

- ANDRÉA, M. M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. **Acta Zool. Mexicana**, v. 26, p. 95-107, 2010.
- ANTONIOLLI, Z. I. ; STEFFEN, G. P. K.; STEFFEN, R. B. Utilização de casca de arroz e esterco bovino como substrato *Eisenia fetida* Savigny (1826). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 3, p. 824-830, 2009.
- AZEVEDO, F. A. & CLASIN, A. A. M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos: Ed. Rima, p. 322, 2003.
- BARTLETT, M. D.; BRIONES, M. J.I.; NEILSON, R.; SCHMIDT, O.; SPURGEON, D.; CREAMER; R.E. A critical review of current methods in earthworm ecology: From individuals to populations. **European Journal of Soil Biology**, v. 46, p.67-73, 2010.
- BOTTINELLI, 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 & Tillage Research**, v. 146, p. 118-124, 2015.
- BROWN, G. G. & DOMINGUEZ, J. Uso das minhocas como bioindicadoras ambientais: princípios e práticas – O 3º Encontro Latino Americano de Taxonomia de Oligoquetas (ELAETA03). **Acta Zool. Mexicana**, v. 2, p. 1-18, 2010.
- CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. **Mar Pollut Bull**, v.44, n.1, p.7-15. 2002.
- CURRY, J. P. Factors affecting the abundance of earthworms in soils. **Earthworm ecology**, v. 2, p. 91-113, 2004.
- DOMÍNGUEZ, J. & PÉREZ-LOSADA, M. *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) y *Eisenia andrei* Bouché, 1972 son dos espécies diferentes de lombrices de tierra. **Acta Zool. Mex.**, v. 26, n. 2, p. 321-331, 2010.

DONKER, M. H.; VAN CAPELLEVEEN, H. E.; VAN STRAALEN, N. M. Metal contamination affects size–structure and life history dynamics in isopod field populations. In *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates* (R. Dallinger and P. S. Rainbow, Eds.), pp. 383–399. Lewis Pub., Chelsea, MI.1993.

GARCIA, M.V. Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. *Ecology and Development Series*, v. 19, p. 281, 2004.

HECKMANN, L.H.; BAAS, J.; JAGER, T. Time is of the essence. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, p. 1396-1398, 2010.

HONEYCUTT, M. E.; ROBERTS, B. L.; ROANE, D. S. Cadmium disposition in the earthworm *Eisenia fetida*. **Ecotoxicol. Environ**, v.30, p. 143-150, 1995.

HOPKIN, S. P. Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. **Elsevier Applied Science**, p. 366, 1989.

HOPKIN, S.P. Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invertebrates. Elsevier Applied Science, 1989.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Soil quality – Effects of pollutants on earthworms – Part 2: Determination of effects on reproduction. ISO 11268-2. Geneva, Switzerland, 1998.

JUBILEUS, M. T.; THERON, P. D.; VAN RENSBURG, L.; MABOETA, M. S. Utilizing *Eisenia andrei* to assess the ecotoxicity of platinum mine tailings disposal facilities. **Ecotoxicology**, v. 22, p.331-338, 2013.

KHALIL, M. A.; ABDEL-LATEIF, H. M.; BAYOUMI, B.M.; VAN STRAALEN, N. M.; VAN GESTEL, C.A.M. Effects of metals and metal mixtures on survival and cocoon production of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. **Pedobiologia**, v. 40, p. 548-556, 1996.

KLOK, C. & A. M. de ROOS. Population level consequences of toxicological influences on individual growth and reproduction in *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae, Oligochaeta). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 33, p. 118 – 127, 1996.

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

- MA, W. Critical body residues (CBRs) for ecotoxicological soil quality assessment: copper in earthworms. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 561–568, 2005.
- MA, W. Toxicity of copper to lumbricid earthworms in sandy agricultural soils amended with Cu-enriched organic waste materials. **Ecological Bulletins**, v. 39, p. 53-56, 1988.
- MABOETA, M.; FOUCHÉ, T. Utilizing an Earthworm Bioassay (*Eisenia andrei*) to Assess a South African Soil Screening Value with Regards to Effects from a Copper Manufacturing Industry. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, n. 3, p. 322-326, 2014.
- MABOETA, M.S.; REINECKE, S.A.; REINECKE, A.J. The relationship between lysosomal biomarker and organismal responses in an acute toxicity test with *Eisenia Fetida* (Oligochaeta) exposed to the fungicide copper oxychloride. **Environmental Research**, v. 96, p. 95-101, 2004.
- MIOTTO, A.; CERETTA, C. A.; BRUNETTO, G.; NICOLOSO, F. T.; GIROTTO, E.; FARIAS, J.G.; TIECHER, T.L.; DE CONTI, L.; TRENTIN, G. Copper uptake, accumulation and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil. **Plant and Soil**, v. 374, p. 593-610, 2014.
- NAHMANI, J.; HODSON., BLACK, S. Effects of metals on life cycle parameters of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated, metal-polluted soils. **Environmental Pollution**, v.149, p. 44-58, 2007.
- NEUHAUSER, E. F.; LOEHR, R. C.; MILLIGAN, D. L.; MALECKI, M. R. Toxicity of metals to the earthworms *Eisenia fetida*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 1, p. 149-152, 1985.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD N° 207. Earthworm, Acute Toxicity Tests. 1984. 9p.
- PHILLIPS, D. R.; BOLGER, T. Sublethal toxic effects of aluminium on the earthworm *Eisenia fetida*. **Pedobiologia**, v. 42, p. 125–130, 1998.
- REINECKE, A. J.; MABOETA, M. S.; REINECKE, S. A. Stimulating effect of low lead concentrations on growth and cocoon production of *Eisenia fetida* (Oligochaeta) South african. **Journal of Zoology**, v. 32, p. 72–75, 1997.

REINECKE, A. J.; REINECKE, S. A.; MABOETA, M. S. Cocoon production and viability as endpoints in toxicity testing of heavy metals with three earthworm species. **Pedobiologia**, v. 45, p. 61-68, 2001.

REINECKE, A. J.; VILJOEN, S. A. The influence of feeding patterns on growth and reproduction of the vermicomposting earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). **Biol Fertil Soil**, v.10, p.184–187, 1990.

ROSOLEN, V.; DE-CAMPOS, A. B.; GOVONE, J. S.; ROCHA, C. Contamination of wetland soils and floodplain sediments from agricultural activities in the Cerrado Biome (State of Minas Gerais, Brazil). **Catena**, v. 129, p. 203-210, 2015.

SCOTT-FORDSMAND, J.J.; WEEKS, J.M. Biomarkers in earthworms. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 165, p. 117-159, 2000.

SIEKIERSKA, E; URBANSKA-JASIK, D. Cadmium effect on the ovarian structure in earthworm *Dendrobaena veneta* (Rosa). **Environ Pollut.**, v. 120, p. 289-297, 2002.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal components analysis in the software assistat-statistical assistance. In: 7th World Congress on Computers in Agriculture, 2009, Reno. Proceedings of the 7th World Congress on Computers in Agriculture. St. Joseph: ASABE, 2009. v. CD-Rom. p.1-5.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Embrapa Meio Ambiente, Documentos No. 42. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 2004.

SPURGEON, D. J & HOPKIN, S. Effects of metal-contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference reference to zinc. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 35, p. 86-95, 1996.

SPURGEON, D. J. & HOPKIN, S. P. The Development of Genetically Inherited Resistance to Zinc in Laboratory-selected Generations of the Earthworm *Eisenia fetida*. **Environmental Pollution**, v. 109, p.193-201, 2000.

SPURGEON, D. J., HOPKIN, S. P., JONES, D. T. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny). **Environ. Pollut.**, v. 84, p. 123-130, 1994.

SPURGEON, D. J.; HOPKIN, S. P. Comparisons of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils. **Appl. Soil Ecol.**, v.11, p. 227–243, 1999.

SPURGEON, D. J.; HOPKIN, S. P. Extrapolation of the laboratory based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites. **Ecotoxicology**, v. 4, p. 190–205, 1995.

SVENDSEN, C. & WEEKS, J. M. Relevance and applicability of a simple earthworm biomarker of copper exposure. I. Links to ecological effects in a laboratory stud with *Eisenia andrei*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 36, p. 72–79, 1997.

VAN GESTEL, C.A.M.; VAN DIS, W.A.; DIRVEN-VAN BREEMEN, E. M.; SPARENBURG, P. M.; BAERSELMAN, R. Influence of cadmium, son of the cadmium copper and pentachlorophenol on growth and sexual development of tary canal of *Eisenia andrei* (Oligochaeta: Annelida). **Biol. Fertil. Soils**, v.12, p. 117–121, 1991.

3 ARTIGO II- Parâmetros bioquímicos em *Eisenia andrei* exposta a solo contaminado com cobre¹

3.1 Resumo

O impacto dos compostos químicos sobre o ambiente pode ser avaliado através de testes ecotoxicológicos, que preveem a toxicidade de uma substância através da resposta do organismo exposto. Uma abordagem sensível para avaliar essa toxicidade é feita através da utilização de biomarcadores, que são avaliações bioquímicas no organismo, úteis como alertas precoces de exposição ao contaminante. O objetivo deste trabalho é analisar os efeitos da exposição de *Eisenia andrei* às diferentes doses de cobre, 0, 35, 70, 105, 140 e 175 mg.Kg⁻¹, a nível enzimático antioxidante, catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), biomarcadores de neurotransmissão como a acetil-colinesterase (AChE) e na peroxidação lipídica através dos níveis de malondialdeído (MDA). As doses de cobre causaram mudanças significativas nos parâmetros avaliados. Nas menores doses de cobre, foi observado um incremento na atividade das enzimas glutathione-S-transferase como mecanismo de defesa antioxidante. O aumento significativo nos níveis de MDA observados e a inibição da atividade da acetil-colinesterase, indicam a ocorrência da peroxidação lipídica da membrana celular e alterações na neurotransmissão em decorrência da presença do metal. Assim, a investigação das enzimas como biomarcadores em minhocas *E. andrei* é uma abordagem eficiente para analisar o potencial de toxicidade do cobre.

Palavras-chave: cobre, *Eisenia andrei*, enzimas antioxidantes, biomarcadores

¹ Artigo elaborado de acordo com as normas da Revista Ecotoxicology and Environmental Safety.

3.2 Introdução

A aplicação de agrotóxicos é uma prática comum da agricultura, e tem por objetivo o controle de pragas e doenças. No entanto, quando usado de forma abusiva, esses insumos podem causar poluição do solo e água, aumentando o potencial de toxicidade e contaminação do ambiente (MIOTTO et al., 2014). Quando estes produtos atingem o solo podem comprometer a biota ali presente (ANDRÉA, 2010).

Estudos têm sido realizados para avaliar os impactos dos compostos químicos em minhocas, através da utilização de testes ecotoxicológicos clássicos, onde é avaliado o comportamento, produção de casulos, mortalidade, entre outros (WU et al., 2012; MABOETA & FOUCHÉ, 2014; XIONG et al., 2014).

No entanto, nos últimos anos pesquisadores vêm buscando abordagens mais sensíveis para avaliar essa toxicidade, tal como a aplicação de biomarcadores (ZHANG et al., 2012; LAVARÍAS et al., 2013). Biomarcador é definido como uma resposta funcional, uma variação bioquímica, histoquímica e fisiológica de um organismo exposto a um estresse induzido por uma substância tóxica (WEEKS & SVENDSEN, 1996). A utilização de organismos tem por objetivo entender e prever os efeitos dos xenobioticos, refletindo a interação entre o sistema biológico e o contaminante (CHAPMAM, 2002). Entre os principais parâmetros utilizados como biomarcadores estão os de estresse oxidativo, através da avaliação da atividade das enzimas antioxidantes.

Os metais pesados apresentam potencial oxidante, tornando as células do organismo exposto suscetíveis aos danos causados por espécies reativas de oxigênio (ERO) (WINSTON & DIGIULIO, 1991). Espécies reativas de oxigênio são moléculas produzidas naturalmente pelas células vivas durante os processos vitais, tais como transporte de elétrons na fotossíntese e respiração aeróbia (NAVROT et al., 2007). Essas ERO geradas pelo metabolismo incluem oxigênio singuleto (1O_2), os íons de superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (OH^{\cdot}) e ainda peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HAJIBOLAND, 2014). Em condições normais, ocorre um equilíbrio entre as moléculas pró-oxidantes e antioxidantes nos organismos (BERNARD et al., 2015).

No entanto, quando os organismos entram em contato com xenobioticos é instalado o processo de estresse oxidativo decorrente da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes (BARBOSA et al., 2010). Logo, a quantificação dos danos oxidativos e os níveis de defesa servem como bioindicadores da contaminação (XIONG et al., 2014). Dentre os mecanismos de defesa comprometidos com a detoxificação das ERO, destaca-se as enzimas de defesa, tais como catalase (CAT), glutathiona S-transferase (GST),

acetilcolinesterase (AChE) (MAIA et al., 2012). Essas enzimas antioxidantes tem como função eliminar as ERO para manter o equilíbrio e reduzir o dano oxidativo da célula (HAN et al., 2014). A enzima antioxidante, catalase (CAT) catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2), protegendo os organismos vivos dos efeitos deletérios do excesso de ERO (CHEN et al., 2011). A acetil-colinesterase (AChE) é um biomarcador enzimático de neurotoxicidade, responsável pela degradação da acetilcolina. Atividade da enzima é inibida pela presença de alguns metais pesados (BODIN et al., 2004). A glutathione S-transferase (GST) é uma enzima que catalisa a conjugação da molécula de glutathione a várias outras moléculas, tendo como papel fundamental a detoxificação intracelular de compostos xenobióticos (CHELVANAYAGAM et al., 2001). O stress oxidativo ocasionado pelo desbalanço das ERO, induz a peroxidação lipídica das estruturas biológicas, ocasionando graves alterações na membrana celular. A extensão dessa peroxidação pode ser medida através dos níveis de TBARS – espécies reativas de ácido tiobarbitúrio (NUNES et al., 2006).

Estudos ecotoxicológicos têm sido realizados através da avaliação da atividade enzimática, tanto em ambientes aquáticos como terrestres, por exemplo medindo a atividade de CAT em minhocas *Eisenia fetida* expostos a solos contaminados com cobre (XIONG et al., 2014), atividade de GST em *Eisenia fetida* expostas a roxarsone e ácido arsênico (RIZWAN-UL-HAQ et al., 2012), bem como a atividade de GST em *Eisenia fetida* expostas ao fungicida Azoxistrobina (HAN et al., 2014). Desta forma, os mecanismos de produção e gestão de ERO são estudados como marcadores de estresse biótico e abiótico, através da medição da atividade enzimática (BERNARD et al., 2015).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho é analisar os efeitos da exposição de *Eisenia andrei* ao cobre a nível enzimático antioxidante (CAT e GST), e através dos níveis de acetilcolinesterase (AChE) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrio (TBARS).

3.3 Material e métodos

3.3.1 Solo Utilizado

O solo utilizado foi coletado na camada de 0-20 cm de uma área de campo da UFSM sem histórico de uso agrícola. O solo foi seco ao ar, destorroado e peneirado com peneira de

malha de 2mm, para separação de fragmentos vegetais e outros resíduos. O solo coletado apresenta as seguintes características: pH em água 5,6; matéria orgânica 1,2%; Argila 26%; CTC 12,9; P 18 mg/L; K 40 mg/L; Ca 6,9 cmol_c/L; Mg 3,3 cmol_c/L; H+Al 2,5 cmol_c/L; Cu 0,4 mg/L; Zn 1,7 mg/L.

3.3.2 Condições experimentais

A montagem do experimento foi realizado no laboratório de Microbiologia do Solo e Ambiente, da Universidade Federal de Santa Maria, no ano de 2014/2015. O ensaio utilizou diferentes doses de cobre, (0, 35, 70, 105, 140, 175 mg.Kg⁻¹), aplicado ao solo na forma líquida de uma solução de sulfato de cobre. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos, com três repetições. As minhocas utilizadas nesse ensaio foram indivíduos adultos clitelados oriundos do minhocário do Departamento de Solos - UFSM.

A montagem do ensaio consistiu em adicionar 500 gramas de solo contaminado com as diferentes doses de cobre, nos recipientes de 1L, formando uma lâmina de solo de 5 cm. A umidade do solo foi mantida em 60% da capacidade de campo. Para cada unidade experimental foi adicionado esterco bovino seco, e em seguida as minhocas previamente pesadas, com massa variando entre 250 e 600 mg cada indivíduo conforme recomendado pela OECD. Os recipientes ficaram em uma sala com temperatura ambiente. Três minhocas foram coletadas de cada recipiente no 3º, 7º, 14º e 28º dia de experimento, após a aplicação das diferentes doses de cobre no solo. As minhocas coletadas nos diferentes tratamentos e nas diferentes datas foram lavadas em água da torneira, e armazenadas em placas de petri sobre filtro de papel húmido por 24 horas (no escuro a 20°C) para esvaziar o conteúdo intestinal.

3.3.3 Ensaio Bioquímicos

As minhocas com intestino esvaziado foram recolhidas de cada tratamento a cada intervalo de tempo, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até serem usadas. Para os ensaios foi preparado um homogeneizado do corpo inteiro da minhoca com tampão 50 mM Tris-sacarose (pH 7,6). As amostras foram mantidas em gelo ao longo de todo o procedimento. Os homogeneizados foram centrifugados a 9000 rpm min⁻¹ durante 20

minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi dividido em alíquotas e armazenadas a ~20°C para as análises enzimáticas.

3.3.4 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da catalase (EC 1.11.1.6) foi medida por espectrofotometria ultravioleta. As amostras de tecido (100 mg) foram homogeneizadas num vidro/ Teflon homogeneizador Potter-elvejhen com 500 µL de tampão TFNa⁺ (0.1 M, pH 7.2) (proporção 1:5), centrifugado a 4,000 rpm durante 15 min. A mistura consistiu em 2,0 ml de tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 7.0), 100 µL de H₂O₂ (0.3 M) e 10 µL do homogeneizado. Mudança de H₂O₂ em 60 segundos foi medida por absorbância a 240 nm (10' em 10' intervalo de leitura). Mmol / min / mg de proteína foi expressa como atividade catalase de acordo com Xu et al., (1997).

3.3.5 Glutathione S- Transferase (GST)

As amostras de tecido das minhocas (50 mg) foram homogeneizadas num vidro/ Teflon homogeneizador Potter-elvejhen com 250 µL de tampão TFNa⁺ (0.1 M, pH 7.2) (proporção 1:5), centrifugado a 4,000 rpm durante 15 min. A atividade de GST (E.C. 2.5.1.18), na amostra foi medido de acordo com Habig et al., (1974), utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A formação de S-2, 4-dinitrofenil glutathione foi monitorizada pelo aumento na absorbância a 340 nm em relação ao branco. O coeficiente de extinção foi usada para CDBN 9,6 mM / mL. A atividade foi expressa como GS-DNB mmol / min / mg de proteína.

3.3.6 Acetil-colinesterase (AChE)

A atividade de AChE (EC 3.1.1.7) foi medida como descrito por Ellman et al. (1961). As amostras de tecido (50 mg) foram homogeneizadas num vidro/ Teflon homogeneizador Potter-elvejhen com 250 µL de tampão TFNa⁺ (0.1 M, pH 7.2) (proporção 1:5), centrifugado a 4,000 rpm durante 15 min, e o sobrenadante foi usado como fonte de enzima. As alíquotas do sobrenadante foram incubadas a 30 ° C durante 2 min com 800 µL tampão fosfato 0,1 M,

pH 7,5, 200 μ L de DTNB 10 mM como cromogénio. Após 2 min, a reação foi iniciada pela adição de acetiltiocolina (CASS; 0,5 mM) como o substrato para a mistura reaccional. O volume final foi de 2,0 mL. Foram determinados absorvâncias a 412 nm durante 2 min. A atividade da enzima foi expressa como micromoles de CASS hidrolisado / min / mg de proteína.

3.3.7 Ensaio de Peroxidação Lipídica (TBARS)

A peroxidação lipídica foi estimado pelo ensaio TBARS, interpretada por uma reação malondialdeído (MDA) com ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), que foi medido opticamente. Nos 100 μ L de amostra foram adicionados 10% de TCA, e o ácido tiobarbitúrico 0,67% foi adicionado para ajustar o volume final de 1,0 mL. A mistura da reação foi colocada num tubo de micro-centrifugadora e incubou-se durante 15 min a 95° C. Após arrefecimento, foi centrifugado a 5000 x g durante 15 min e a densidade óptica foi medida por espectrofotometria a 532 nm. Níveis de TBARS foram expressos como nmol MDA / mg proteína de acordo com Wang (1978).

3.3.8 Determinação de Proteínas

A proteína foi determinada por espectrofotometria utilizando a albumina de soro bovino como padrão e 10 μ L de amostra. A absorvância das amostras foi medida a 595 nm de acordo com Bradford et al. (1976).

3.3.9 Analise estatística

A distribuição normal e a homogeneidade dos dados foram confirmadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett's, respectivamente. Após confirmação, os dados quando paramétricos seguiram com teste de ANOVA de uma via, e teste de Tukey post hoc. Quando os dados foram confirmados não paramétricos estes seguiram para o teste de Kruskal-Wallis. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. O valor de P foi considerado

significativo quando $\leq 0,05$. As análises foram executadas no software Graph Pad Prism 5.0 (San Diego USA).

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Efeito do cobre sobre a atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST) em *Eisenia andrei*

A atividade da enzima GST nas minhocas presentes nos solos contaminados com cobre foram maiores do que nos controles (Figura 1 A). No terceiro dia de exposição, foi observado um aumento significativo em todas as doses de cobre, sendo que a dose de 105 mg.Kg⁻¹ Cu apresentou maior atividade enzimática. Aos 7 dias de exposição, a atividade da GST nas minhocas expostas as diferentes doses de cobre foi semelhante ao do controle, (Figura 1 B), não diferindo estatisticamente. Aos 14 e 28 dias, todas as minhocas expostas ao cobre apresentaram maior atividade enzimática em relação ao controle, (Figura 1 C/D).

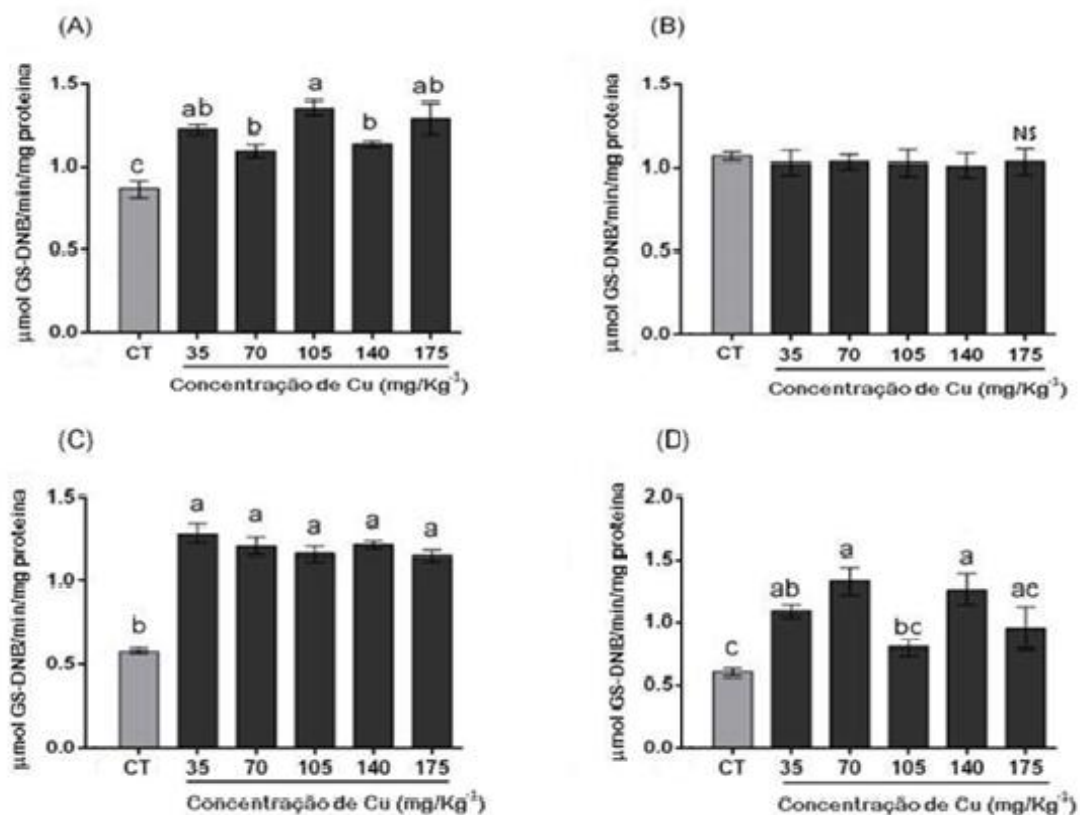


Figura 1: Atividade de glutathiona S-transferase em *Eisenia andrei* expostas a diferentes doses de cobre, ao controle = CT em diferentes tempos de exposição. (A) aos 3 dias, (B) aos 7 dias, (C) aos 14 dias, e (D) aos 28 dias de exposição. Diferentes letras acima das barras indicam diferenças significativas a $p < 0,05$ entre tratamentos.

A atividade enzimática é considerada um biomarcador da poluição ambiental, e possui a função de proteger a célula dos efeitos adversos das espécies reativas de oxigênio, tais como a enzima GST (ZHOU et al., 2013). Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que minhocas *Eisenia andrei* expostas a concentrações subletais de cobre apresentaram mudanças significativas na atividade da enzima glutatona S-transferase. Este resultado apresenta similaridade com estudos anteriores, onde foram observados aumento na atividade de GST em diferentes espécies de minhocas expostas a oligoelementos, pesticidas e contaminantes orgânicos (RODRÍGUEZ-CASTELLANOS & SANCHEZ-HERNANDEZ, 2007; MAITY et al., 2008; BANNI et al., 2009).

Em estudos com organismos expostos a metais a campo e em laboratório foi observado o desencadeamento do processo de defesa antioxidante contra ERO através da enzima GST (MARTIN-DIAZ et al., 2008; BANNI et al., 2009; FERREIRA- CRAVO et al., 2009). Lukkari et al. (2004) observaram que minhocas *Aporrectodea tuberculata* expostas à concentração de 400 mg.Kg^{-1} Cu, apresentaram aumento na atividade da enzima GST. No estudo de ŁASZCZYCA et al. (2004), também foi verificado um incremento na atividade da GST em minhocas *Aporrectodea tuberculata* expostas à contaminação com metais em solos, sendo que os teores de cobre no solo foram de 38 mg.Kg^{-1} . Os resultados demonstrados nos diferentes estudos indicam que a enzima GST é induzida como mecanismo de defesa antioxidante, quando o organismo está exposto a metais pesados como o cobre. As mudanças observadas na atividade da enzima reflete o mecanismo que os organismos possuem para proteger da toxicidade do contaminante.

No presente trabalho, aos sete dias de exposição, a atividade da enzima nas minhocas expostas as diferentes doses de cobre foi semelhante ao do controle. Esta ausência de aumento na atividade enzimática nas doses de cobre pode estar relacionada com o aumento da tolerância através de outros mecanismos de desintoxicação (Posthuma & Van Straalen, 1993).

A investigação dos biomarcadores enzimáticos em minhocas é uma excelente alternativa para avaliar o potencial de toxicidade ecológica do cobre, pois em contato com o metal pesado, as células do organismo exposto ficam suscetíveis aos danos causados por espécies reativas de oxigênio (ERO). As enzimas antioxidantes, tais como a GST tem a função de eliminar as ERO para manter o equilíbrio e reduzir o dano oxidativo (HAN et al., 2014). A elevação observada na atividade da enzima GST, que neste estudo ocorre já nas doses mais baixas de cobre, reflete o mecanismo de defesa ao provável estado de estresse oxidativo desencadeado pela presença do metal no solo.

3.4.2 Efeito do cobre sobre a atividade da enzima acetil-colinesterase (AChE) em *Eisenia andrei*

A atividade da enzima acetil-colinesterase nas minhocas recolhidas dos solos contaminados com cobre no terceiro dia de exposição foi variável, (Figura 2 A). Nas doses de 35 e 140 mg.Kg⁻¹ Cu foi observada uma redução significativa na atividade da enzima em relação ao controle, e na maior dose de cobre a atividade enzimática foi semelhante ao controle, não diferindo estatisticamente (Figura 2 A).

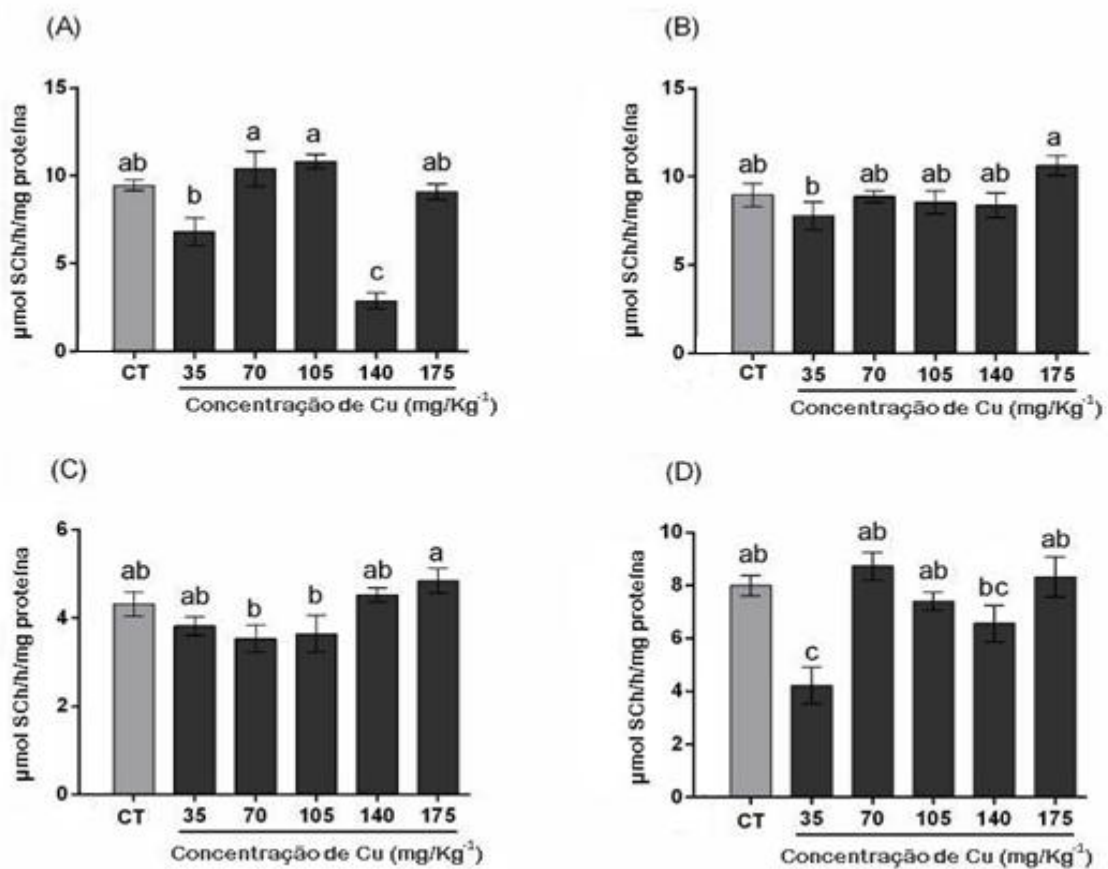


Figura 2: Atividade da acetilcolinesterase em *Eisenia andrei* expostas a diferentes doses de cobre e ao controle = CT em diferentes tempos de exposição. (A) aos 3 dias, (B) aos 7 dias, (C) aos 14 dias, e (D) aos 28 dias de exposição. Diferentes letras acima das barras indicam diferenças significativas a $p < 0,05$ entre tratamentos.

Nas doses de 70 e 105 mg.Kg⁻¹ Cu foi verificado um aumento na atividade da enzima. Aos 7 dias de exposição, a atividade de AChE nas minhocas expostas as doses crescentes de cobre foi semelhante ao controle, (Figura 2 B), apenas na dose de 175 mg.Kg⁻¹ foi observado um aumento significativo na atividade da acetilcolinesterase.

Aos 14 dias, as minhocas expostas a dose de 70 e 105 mg.Kg⁻¹ cobre apresentaram

menor atividade enzimática em relação ao controle, (Figura 2 C). Na dose de 175 mg.Kg⁻¹ ocorreu um incremento na atividade de AChE neste período. Ao final do experimento (28 dias), foi observada uma redução na atividade da enzima na dose de 35 e 140 mg.Kg⁻¹ Cu em relação ao controle, (Fig 2 D). O restante das doses testadas (70, 105 e 175 mg.Kg⁻¹) não apresentaram diferença significativa em relação ao controle.

A enzima AChE, em função de seu importante papel na neurotransmissão, é considerada altamente vulnerável as alterações abióticas e sua atividade pode ser usada como biomarcador de exposição a compostos tóxicos (BANNI et al., 2010). Vieira et al. (2009) observou que peixes em presença de metais, como cobre e mercúrio, apresentaram atividade da acetilcolinesterase inibida. Porém, Hackenberger et al. (2012) verificaram que minhocas *Eisenia andrei* expostas a baixos níveis de substâncias tóxicas apresentaram resposta de compensação na produção da enzima, levando a uma adaptação temporária através do aumento da produção enzimática.

No presente trabalho, no terceiro dia de exposição, foi observado um incremento na atividade da enzima nas doses de 70 e 105 mg.Kg⁻¹ cobre e uma inibição na dose de 140 mg.Kg⁻¹ cobre. Este aumento observado, nas menores doses, pode ser uma resposta compensatória protetora a toxicidade ocasionada pela exposição do organismo ao cobre. Este comportamento pode levar uma relação dose-resposta bifásica chamada de hormesis. Hormesis é caracterizado por um aumento na atividade da enzima em doses baixas e uma inibição em doses altas (STENERSEN, 1980). Portanto é possível concluir que as menores doses de cobre e o pouco tempo de exposição, levou uma adaptação temporária ocasionando um aumento na atividade da acetilcolinesterase em minhocas *Eisenia andrei*.

Porém, aos 14 dias de exposição, nas mesmas doses de cobre (70 e 105 mg.Kg⁻¹) foi observada uma inibição na atividade enzimática. Esta exposição contínua ao metal pode ter excedido a capacidade das células em suportar o estresse, conduzindo assim a uma diminuição na atividade da enzima, fazendo com que o neurotransmissor acetilcolina se acumule, conduzindo a uma desordem no sistema nervoso. Já na maior dose de cobre, (175 mg.Kg⁻¹), foi observado um incremento na atividade da acetilcolinesterase. Este fenômeno de indução pode ser explicado devido seu envolvimento com a apoptose celular, onde a AChE é liberada após a ruptura da membrana celular, explicando assim o seu aumento (ZHANG et al., 2002).

3.4.3 Efeito do cobre sobre a enzima catalase (CAT) em minhocas *Eisenia andrei*

No experimento, não foi observada diferença significativa na atividade da enzima catalase em minhocas expostas as diferentes doses de cobre e nos diferentes tempos de exposição, Figura 3.

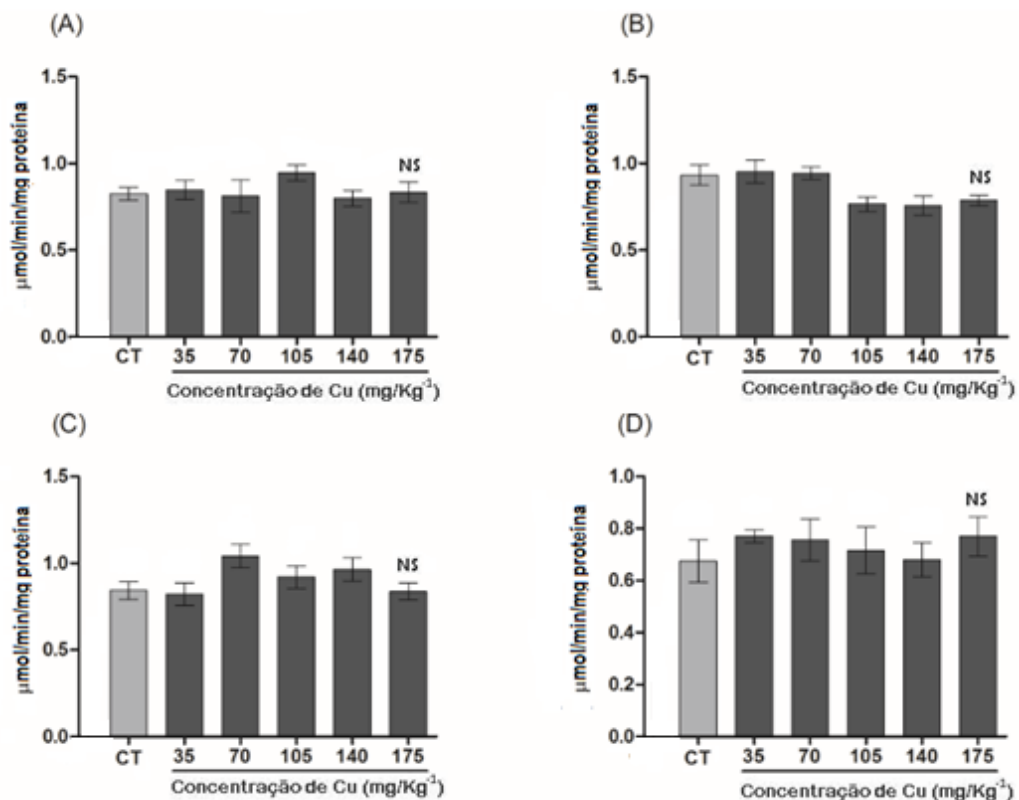


Figura 3: Atividade da catalase em *Eisenia andrei* expostas a diferentes doses de cobre e ao controle = CT, em diferentes tempos de exposição. (A) aos 3 dias, (B) aos 7 dias, (C) aos 14 dias, e (D) aos 28 dias de exposição. Diferentes letras acima das barras indicam diferenças significativas a $p < 0,05$ entre tratamentos.

Devido os efeitos graves do estresse oxidativo, as células dos organismos tendem a manter em baixos níveis as espécies reativas de oxigênio através do sistema de eliminação que inclui enzimas antioxidantes, tais como a catalase. A catalase é uma enzima do metabolismo de fase II (WU et al., 2012), importante no sistema antioxidante, alterações em sua atividade refletem o estresse oxidativo que podem ser induzidos por poluentes (LIN et al.,

2010).

No presente trabalho, não foi observada diferença significativa na atividade da enzima catalase. A explicação para esse resultado pode ser que a defesa natural anti-oxidante foi saturada, a quantidade gerada de espécies reativas de oxigênio excedeu a capacidade de defesa do organismo, ocasionando a redução gradual na atividade da enzima (ZHOU et al., 2013).

3.4.4 Efeito do cobre no nível de peroxidação lipídica em *Eisenia andrei*

O efeito do cobre sobre a peroxidação lipídica foi determinada pela avaliação do teor de MDA em minhocas *Eisenia andrei*, (Figura 4). No terceiro dia de exposição, não foi observada diferença significativa (Figura 4 A). Aos 7 dias de exposição, foi observado um aumento significativo nos níveis de MDA das diferentes doses de cobre em relação ao controle, exceto na dose de 140 mg.Kg⁻¹, onde observou-se uma redução nos níveis de MDA (Figura 3 B). Na exposição de 14 dias, um aumento nos níveis de MDA foi observado apenas nas maiores doses de cobre. No entanto no tempo de exposição mais longo (28 dias), os maiores níveis de MDA foram verificados nas doses de 70 e 140 mg.Kg⁻¹ Cu.

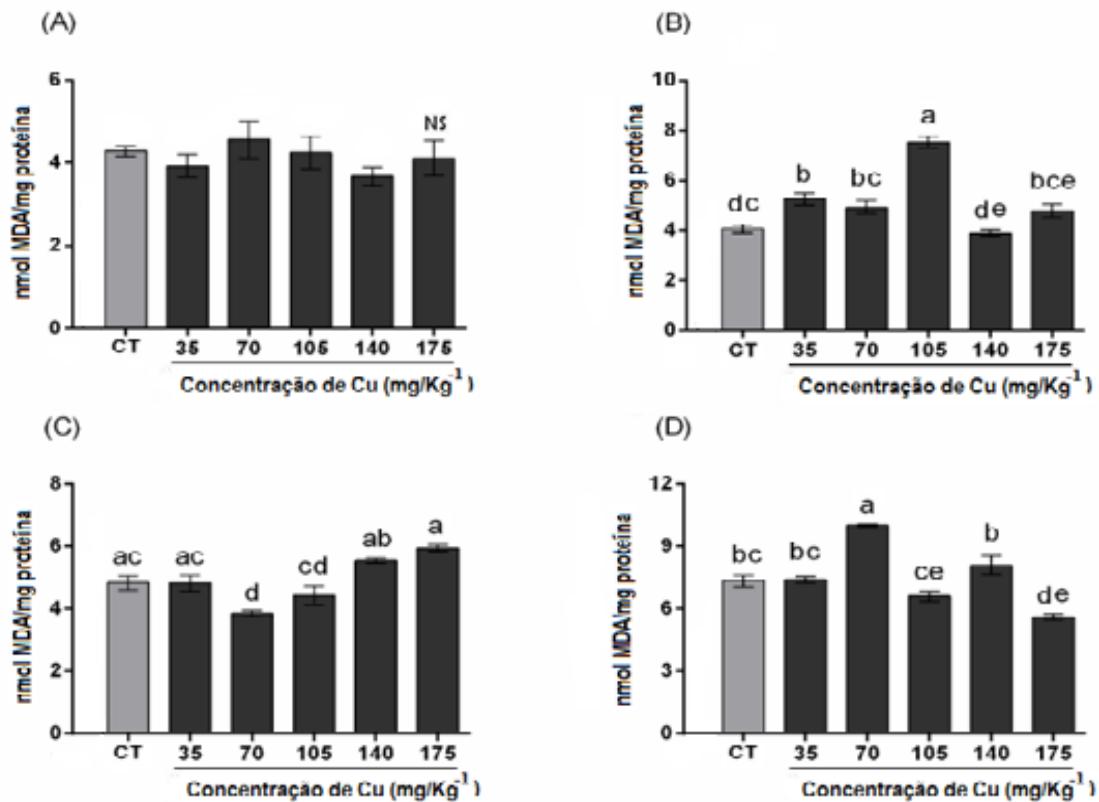


Figura 4: Níveis de malondialdeído em *Eisenia andrei* expostas a diferentes doses de cobre e ao controle = CT, em diferentes tempos de exposição. (A) aos 3 dias, (B) aos 7 dias, (C) aos 14 dias, e (D) aos 28 dias de exposição. Diferentes letras acima das barras indicam diferenças significativas a $p < 0,05$ entre tratamentos.

Estudos anteriores mostraram que danos ocasionados nas células de organismos expostos a contaminantes são originados pelo aumento na síntese de espécies reativas de oxigênio (GERACITANO et al., 2002; XUE et al., 2009). Dentre estes danos ocasionados está a peroxidação de lipídios da membrana celular, que pode ser medido pelos níveis de MDA (SHALATA et al., 1998). Bouraoui et al. (2009) observaram que os anelídeos da espécie *Hediste diversicolor* expostos a cobre apresentaram peroxidação lipídica da membrana celular, evidenciada pelo aumento dos níveis de MDA com o passar do tempo. Gaete et al. (2010) verificaram resultado similar em que minhocas *Eisenia fetida* expostas a doses crescentes de cobre, apresentaram aumento significativo nos danos lipídicos. Este dano ocasionado pela exposição dos organismos ao cobre se deve ao potencial redox do metal, que gera espécies reativas de oxigênio através de Harber-Weiss e reação de Fenton (BOURAOUI et al., 2009).

Neste estudo, aos 3 dias de exposição não foi observada diferença significativa nos

níveis de MDA em relação ao controle. Este resultado sugere uma defesa eficiente das enzimas antioxidantes, pois foi possível observar que no mesmo período e dose a atividade da enzima GST foi elevada em relação ao controle, indicando uma tentativa de defesa.

Com o passar dos dias, e aumento do tempo de exposição foi observada uma elevação nos níveis de MDA, caracterizando o efeito tóxico do metal. No mesmo período de exposição, a atividade da enzima GST não apresentou diferença em seus níveis em relação ao controle. Cunha et al. (2007) relataram que em presença de metais pode ocorrer uma regulação negativa dos genes de GST, ocasionando uma acumulação das espécies reativas de oxigênio e eletrólitos intermediários, causando inativação de outras enzimas antioxidantes e por consequência a peroxidação lipídica.

Aos 14 dias de exposição apenas nas maiores doses de cobre foi observado aumento significativo nos níveis de MDA em relação ao controle. Este resultado está de acordo com os encontrados por Zhou et al. (2013), onde minhocas *Eisenia fetida* expostas concentrações crescentes de cobre apresentaram aumento significativo nos danos lipídicos. Em concentrações elevadas, o cobre é considerado tóxico (TOTH et al., 1996), ocasionando alterações diretas nas proteínas intercelulares através da desnaturação das enzimas ou indiretamente pela geração de espécies reativas de oxigênio (DROGE, 2002). No presente estudo o aumento nos níveis de MDA observado está relacionado com a peroxidação lipídica da membrana celular das minhocas, sugerindo uma defesa antioxidante insuficiente.

3.5 Conclusões

- O aumento na atividade da enzima glutathione S-transferase das minhocas expostas ao cobre evidencia o mecanismo de defesa do organismo em resposta ao estresse causado pelo contaminante.
- Os níveis de MDA apesar de não apresentarem um padrão uniforme em relação as doses crescentes de cobre, demonstraram a peroxidação lipídica ocasionada na membrana celular das minhocas em decorrência da exposição ao metal.
- A atividade da enzima acetil-colinesterase variou em relação as doses e o tempo de exposição, sendo possível concluir que a inibição na atividade da enzima observada reflete o efeito negativo da exposição ao cobre.

- As enzimas antioxidantes utilizadas se apresentaram eficientes como biomarcadores da toxicidade de cobre em minhocas *Eisenia andrei*, podendo ser utilizada como ferramenta de monitoramento de solos contaminados.

REFERÊNCIAS

ANDRÉA, M. M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. **Acta Zool. Mexicana**, v. 26, p. 95-107, 2010.

BANNI, M.; BOURAOUI, Z.; CLERANDEAU, C.; NARBONNE, J.F; BOUSSETTA, H. Mixture toxicity assessment of cadmium and benzo[a]pyrene in the sea worm *Hediste diversicolor*. **Chemosphere**, v.77, p. 902–906, 2009.

BANNI, M.; NEGRI, A.; DAGNINI, A.; JEBALI, J.; AMEUR, S.; BOUSSETTA, H. Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p.842–848, 2010.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v.23, p. 629-643, 2010.

BERNARD, F.; BRULLE, F.; DUMEZ, S.; LEMIERE, S.; PLATEL, A.; NESSLANY, F.; CUNY, D.; DERAM, A.; VANDENBULCKE, F. Antioxidant responses of Annelids, Brassicaceae and Fabaceae to pollutants: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 114, p. 273-303, 2015.

BODIN, N.; BURGEOT, T.; STANISIÈRE, J.Y.; BOCQUENÉ, G; MENARD, D.; MINIER, C.; BOUTED, I.; AMAT, A.; CHEREL, Y.; BUDZINSKI, H. Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 138, p. 411 – 427, 2004.

BOURAOUI, Z.; BANNI, M.; GHEDIRA, J.; CLEARANDEAU, C.; NARBONNE, J. F.; BOUSSETTA, H. Evaluation of enzymatic biomarkers and lipoperoxidation level in *Hediste diversicolor* exposed to copper and benzo[a]pyrene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1893-1898, 2009.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 7–15, 2002.

CHELVANAYAGAM, G.; PARKER, M.W.; BOARD, P.G. Fly fishing for GSTs: a unique nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 133, p. 256–260, 2001.

CHEN, C.; ZHOU, Q.; LIU, S.; XIU, Z. Acute toxicity, biochemical and gene expression responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks. **Chemosphere**, v. 83, p. 1147–1154, 2011.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Rev. Physiol.**, v.82, p. 47–95, 2002.

ELLMAN, G. L.; COURTNET, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2.ed. Rio de Janeiro, RJ: EMBRAPA Solos, 2006. 306 p.

FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; SANDRINI, J. Z.; AMADO, L.L.; GERACITANO, L.A.; REBELO, M.; BIANCHINI, A.; MONSERRAT, J. M. Antioxidant responses in different body regions of the polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae) exposed to copper. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p. 388–393, 2009.

GAETE, H.; HIDALGO, M. E.; NEAMAM, A.; ÁVILA, G. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE COBRE EN SUELOS A TRAVÉS DE BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN *Eisenia foetida*. **Quim. Nova**, v. 33, p. 566-570, 2010.

- GERACITANO, L.; MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI, A. Physiological and antioxidante enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) to copper. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 277, p. 145-156, 2002.
- HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.249, p. 7130-7139, 1974.
- HACKENBERGER, B. K.; VELKI, M.; STEPIC, S.; HACKENBERGER, D. K. O efeito da formalina sobre as actividades da acetilcolinesterase e catalase, e na concentração de oximas, nas espécies de minhocas *Eisenia andrei*. **European Journal of Soil Biology**, v.50, p. 137–143, 2012.
- HAJIBOLAND, R. Chapter 1 – Reactive Oxygen Species and Photosynthesis. Oxidative Damage to Plants, p. 1- 63, 2014.
- HAN, Y.; ZHU, L.; WANG, J.; WANG, J.; XIE, H.; ZHANG, S. Integrated assessment of oxidative stress and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to azoxystrobin. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p. 2014-219, 2014.
- LASZCZYCA, P.; AUGUSTYNIAK, M.; BABCZYNSKA, A.; BEDNARSKA, K.; KAFEL, A.; MIGULA, P.; WILCZEK, G.; WITAS, I. Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland). **Environment International**, v. 30, p. 901– 910, 2004.
- LIN, D.; ZHOU, Q.; XIE, X.; LIU, Y. Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*). **Chemosphere**, v.81, p. 1328–1333, 2010.
- LUKKARI, T.; TAAVITSAINEN, M.; SOIMASUO, M.; OIKARI, A.; HAIMI, J. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier metal exposure. **Environmental Pollution**, v.129, p. 377–386, 2004.
- MABOETA, M.; FOUCHÉ, T. Utilizing an Earthworm Bioassay (*Eisenia andrei*) to Assess a South African Soil Screening Value with Regards to Effects from a Copper Manufacturing Industry. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, n. 3, p. 322-326, 2014.

- MAITY, S.; ROY, S.; CHAUDHURY, S.; BHATTACHARYA, S. Antioxidant responses of the earthworm *Lampito mauritii* exposed to Pb and Zn contaminated soil. **Environmental Pollution**, v. 151, p. 1-7, 2008.
- MARTÍN-DÍAZ, M.L.; BLASCO, J.; SALES, D.; DELVALLS, T.A. Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports. **Environmental Pollution**, v. 151, p. 631-640, 2008.
- MIOTTO, A.; CERETTA, C. A.; BRUNETTO, G.; NICOLOSO, F. T.; GIROTTO, E.; FARIAS, J.G.; TIECHER, T.L.; DE CONTI, L.; TRENTIN, G. Copper uptake, accumulation and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil. **Plant and Soil**, v. 374, p. 593-610, 2014.
- NUNES, B.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. **Chemosphere**, v. 62, p. 581 – 594, 2006.
- RIZWAN-UL-HAQ, M.; ZHENLING, Z.; YONGXUE, S.; WENQUANG, X. Evaluation of glutathione s-transferase as toxicity indicator for roxarsone and arsanilic acid in *Eisenia fetida*. **J Appl Toxicol.**, v. 32, p. 731–738 2012.
- RODRÍGUEZ-CASTELLANOS, L. & SANCHES-HERNANDEZ, J. C. Earthworm biomarkers of pesticide contamination: Current status and perspectives. **Journal of Pesticide Science**, v. 32, p. 360–371, 2007.
- SHALATA, A., TAL, M. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. **Physiol. Plant**, v. 104, p. 169–174, 1998.
- STENERSEN, J. Esterases of earthworms. Part II: Characterisation of the cholinesterases in the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny) by ion exchange chromatography and electrophoresis. **Comp. Biochem. Physiol**, v. 66, p.45–51, 1980.
- TÓTH, L.; JUHASZ, M.; VARGA, T.; CSIKKEL-SZOLNOKI, A.; NEMCSOK, J.; Some effect of CuSO₄ on carp, **J. Environ. Sci. Health**, v. 31, p. 627–635, 1996.
- VIEIRA, L.R.; GRAVATO, C.; SOARES, A.M.V.M.; MORGADO, F.; GUILHERMINO, L. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behavior. **Chemosphere**, v. 76, p. 1416–1427, 2009.

- WEEKS, J. M. & SVENDSEN, C. Neutral red retention by lysosomes from earthworm (*Lumbricus rubellus*) coelomocytes: a simple biomarker of exposure to soil copper. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, p. 1801–1805, 1996.
- WINSTON, G. W.; DIGIULIO, R. T. Prooxidant and Antioxidant Mechanisms in Aquatic Organisms. **Aquat Toxicol**, v.19, n.2, p.137-161, 1991.
- WU, S.; ZHANG, H.; ZHAO, S.; WANG, J.; LI, H.; CHEN, J. Respostas de biomarcadores de minhocas (*Eisenia fetida*) expoused para fenantreno e pireno tanto individualmente como combinados em microcosmos. **Chemosphere**, v. 87, n. 4, p. 285-293, 2012.
- XIONG, W.; DING, X.; ZHANG, Y.;SUN, Y. Ecotoxicological effects of a veterinary food additive, copper sulphate, on antioxidant enzymes and mRNA expression in earthworms. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, p. 134-140, 2014.
- XU, J. B.; YUAN, X. F.; LANG, P. Z. Determination of catalase activity and catalase inhibition by ultraviolet spectrometry. **Environmental Chemistry**, v. 16, p. 73–76, 1997.
- XUE, Y.; GU, X.; WANG, X.; SUN, C.; XU, X.; SUN, J.; ZHANG, B. The hydroxyl radical generation and oxidative stress for the earthworm *Eisenia fetida* exposed to tetrabromobisphenol A. **Ecotoxicology**, v. 18, p. 693–699, 2009.
- YU-LI, X.; LUO, Y.; YUN, M.; WANG, J.; WANG, J. Effects of 1-methyl-3-octylimidazolium bromide on the anti-oxidant system of earthworm. **Chermosphere**, v. 78, p. 853-858, 2010.
- ZHANG, X. J.; YANG, L.; ZHAO, Q.; CAEN, J.P.; HE, H.Y.; JIN, Q. H.; GUO, L.H.; ALEMANY, M.; ZHANG, L.Y.; SHI, Y.F. Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. **Cell Death and Differentiation**, v. 9, p. 790-800, 2002.
- ZHOU, C.F.; WANG, Y; LI, C. C.; SUN, R.J.; YU, Y.; ZHOU, D. Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (*Eisenia fetida*). **Environmental Pollution**, v. 180, p. 71-77, 2013.