

ENSAIO PRELIMINAR DE COMPORTAMENTO COM OLIGOQUETAS (*Eisenia andrei*) EM DEJETOS DE BOVINOS SUBMETIDOS A INDUÇÃO ARTIFICIAL DE LACTAÇÃO

LUCAS LOURENÇO CASTIGLIONI GUIDONI¹; VANESSA FARIA DE OLIVEIRA²;
JOSÉ VICTOR VIEIRA ISOLA³; BERNARDO GARZIERA GASPERIN⁴; ERICO
KUNDE CORRÊA⁵; THOMAZ LUCIA JR⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – lucaslcg@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – vanessafoliveira@outlook.com

³Universidade Federal de Pelotas – jvvisola@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – bbgasperin@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – ericokundecorrea@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – tluciajr@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Para contornar transtornos reprodutivos em bovinos leiteiros e prejuízos na produção, a indução à lactação é sugerida como alternativa para que os animais produzam leite sem a necessidade de gestação (LUZ et al., 2020). Os compostos que mimetizam o processo são hormônios sintéticos, como benzoato de estradiol, progesterona, prostaglandina, dexametasona e bST, ou análogos.

Por outro lado, o ato legislativo 2003/74/CE da Comissão Europeia proíbe o uso de algumas substâncias como o 17 β -estradiol para procedimentos veterinários, devido principalmente aos possíveis efeitos de consumo de alimentos na saúde humana. No entanto, o potencial de perturbações endócrinas de atividades antropogênicas ainda é vaga quanto aos impactos ambientais, tendo como possíveis consequências a feminização da fauna aquática, distúrbios reprodutivos, infertilidade ou câncer (BILAL; IQBAL, 2019).

Nesse cenário, os dejetos das vacas leiteiras são os principais contribuintes de hormônios estrogênicos (endógenos) entre os diferentes animais de produção (JOHNSON et al., 2006). Os desreguladores endócrinos produzidos naturalmente, como 17 β -estradiol e estrona, ou outros sintéticos, são cada vez mais estudados do ponto de vista da toxicologia ambiental, através do uso de organismos biológicos (zebrafish, minhocas), testes de reprodução, análises genéticas e enzimáticas (SOUDER; GORLICK 2017; HEGER et al., 2015).

Todavia, em busca de testes mais práticos, o ensaio de comportamento de fuga com minhocas pode ser aplicado para avaliar alguns contaminantes e a função de *habitat* de solos ou materiais orgânicos (NBR ISO 17512-1:2011). O presente trabalho tem como objetivo verificar a sensibilidade do método de comportamento com minhocas para avaliar dejetos de bovinos submetidos a protocolos de indução artificial de lactação.

2. METODOLOGIA

As amostras testadas consistem em fezes de bovinos submetidos a protocolos de indução artificial de lactação (Grupo 1 – protocolo padrão, Grupo 2 – protocolo curto), proveniente de subamostras de 5 animais de cada grupo, coletadas na 2ª semana da administração das substâncias. As novilhas utilizadas são da raça holandesa (30 meses idade, 430 kg), incapazes de conceber em tentativas anteriores de reprodução. Até o momento das coletas consideradas nesse trabalho, os animais receberam aplicações de 30 mg de benzoato de

estradiol (BE) (Gonadiol® Zoetis Produtos Veterinários, Campinas, Brasil) e 300mg de progesterona (Sincrogest® Ourofino Saúde Animal, São Paulo, Brasil) diariamente do 1º ao 8º dia. Do 9º ao 14º, apenas os animais do protocolo padrão (Grupo 1) receberam doses diárias de 20mg de BE. Como grupo controle (Gc), foram utilizados dejetos de vacas em gestação (n=5), sem protocolo.

No ensaio de comportamento de fuga foram utilizados 60 minhocas, com clitelo desenvolvido, peso médio de 0,63 g, da espécie *Eisenia andrei* Bouché (1972), proveniente de criação no Laboratório de Resíduos e Toxicologia Ambiental/UFPEL. As matrizes dessa população foram doadas pelo minhocário da Embrapa Clima Temperado Estação Experimental Cascata/Pelotas-RS.

O solo artificial utilizado foi adaptado da ABNT 11269-2:2014, conteúdo Areia quartzosa industrial, argila caulínica, serapilheira triturada, na relação 70:20:10 (m:m). Os recipientes (0,5 L) foram separados em dois compartimentos por meio de um divisor vertical. Em um dos lados foi colocado o controle (solo artificial ou amostra de referência a ser comparada), com 40 mm de altura. E a outra metade foi ocupada com o solo/amostra em teste, conforme condições apresentadas na Tabela 1. Em seguida, o divisor foi removido e 5 minhocas foram colocadas na fenda deixada pela separação das amostras. Os recipientes-teste com lateral coberta, foram colocados em sala em temperatura ambiente e luminosidade natural. Após 48 hrs a contagem foi realizada. O pH e faixa de umidade foram determinados com pHmetro de bancada e higrômetro de campo.

Tabela 1 – Condições experimentais do ensaio preliminar de fuga com minhocas.

Combinação-teste*	Composição amostra teste	Variáveis dependentes
Controle x Amostra teste	Amostra: Solo artificial (%; v:v)	
SA x G1	100 / 0	Organismos vivos; Fuga.
SA x G1:SA	12,5 / 87,2	
SA x Gc	100 / 0	
SA x Gc:SA	12,5 / 87,2	
Gc x G1	100 / 0	
G2 x G1	100 / 0	

*duplicata; SA = solo artificial; G1 = dejetos de animais com lactação artificial, protocolo padrão; G2 = dejetos de animais com lactação artificial, protocolo curto; Gc = dejetos de animais controle.

O cálculo do ensaio foi realizado conforme Equação 1:

$$F_{\%} = \frac{n_c - n_t}{N} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

onde $F_{\%}$ é a fuga na amostra teste, expressa em porcentagem; n_c é o número de minhocas no solo-controle nas replicatas somadas; n_t é o número de minhocas no solo-teste das replicatas; e N é o número total de minhocas somadas todas replicatas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 foi mostrado a ausência de letalidade e a contagem de organismos no solo teste. O ensaio é considerado invalidado se mais de 10% dos organismos for perdido (RASTETTER; GERHARDT, 2018). Apenas os organismos no teste com dejetos de Gc apresentaram 100% de fuga, possivelmente devido a alta umidade registrada. As condições de pH foram alcalina e umidade média a alta. Geralmente, o pH preferido é entre 6-7,5 e umidade média (55-65%), mas não excessiva (NIVA; BROWN, 2019).

Tabela 2 – Médias de organismos vivos na amostra teste e letalidade no ensaio.

Combinação teste*	Letalidade	Amostra teste		
		Organismos vivos	pH	Umidade (%)
SA x G1	0	4,5 ± 0,7	7,85 ± 0,01	60-70
SA x G1:SA	0	4,0 ± 0,0	8,06 ± 0,06	55-65
SA x Gc	0	0,0 ± 0,0	7,00 ± 0,04	> 70
SA x Gc:SA	0	2,3 ± 0,4	7,82 ± 0,02	55-65
Gc x G1	0	5,0 ± 0,0	7,85 ± 0,01	60-70
G2 x G1	0	1,8 ± 1,1	-	-

*Solo-referência x Amostra-teste; SA = solo artificial; G1 = dejetos de animais com lactação artificial, protocolo padrão; G2 = dejetos de animais com lactação artificial, protocolo curto; Gc = dejetos de animais controle.

*misturas amostras teste(G1, Gc):SA 12,5:87,5 (% v:v). SA: pH = 7,61; U%=50-60. G2: pH=7,82; U%=60-70.

Na Figura 1, o comportamento resposta foi apresentado para as combinações testadas. Para uma distribuição homogênea, a proporção de minhocas deve ser entre 40-60% para cada lado (NBR ISO 17512-1:2011), como é o caso das combinações com mistura com de G1 (G1:SA) e no teste com G2. Enquanto, solos-teste com mais de 80% de fuga são considerados com sua função de *habitat* limitada. No caso de respostas negativas ou com 0% de fuga as minhocas preferem o solo teste (atração). Caso a atração for > 80 % pela amostra-teste, a presença de substâncias químicas não pode ser descartada.

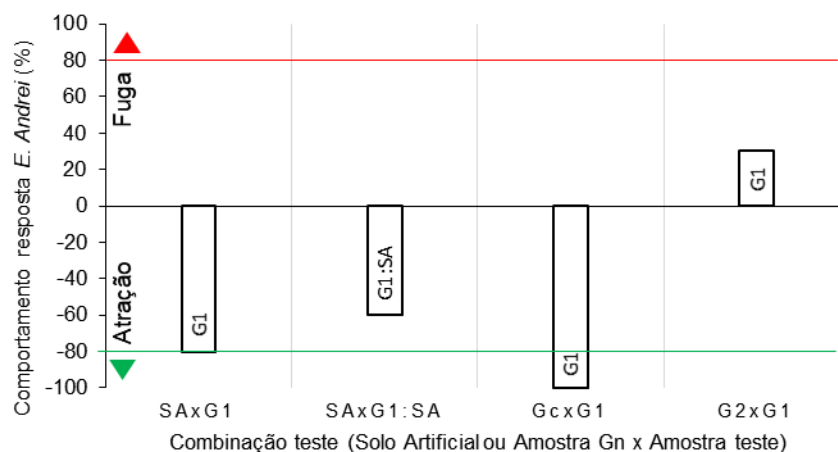


Figura 1 – Resposta de fuga de *Ensenia andrei* depois do ensaio combinando solo artificial e amostras de dejetos de bovinos submetidos a protocolo de indução artificial de lactação. G1 = dejetos de animais com lactação artificial, protocolo padrão; G2 = dejetos animais com lactação artificial, protocolo curto; Gc = dejetos animais controle. *misturas amostras teste(G1, Gc):SA 12,5:87,5 (% v:v).

ZHANG et al. (2014) detectou a concentração de estrogênio total (livre e conjugado) entre 145-179 µg/vaca/d, sendo principalmente pelas fezes (92% do total da excretas). No entanto, o presente teste não mostrou oferecer sensibilidade para indicar efeito no comportamento em oligogueta.

4. CONCLUSÕES

O ensaio preliminar indicou que todos organismos sobreviveram aos testes, confirmando a validade do ensaio. Não houve evidências que a administração de estrogênios em protocolos artificiais de lactação tenham como consequência dejetos limitados em servir de *habitat* para biota do solo e suas interações. Para ensaios futuros recomenda-se testes com maior tempo de exposição e análises moleculares.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BILAL, M.; IQBAL, H.M. Persistence and impact of steroidal estrogens on the environment and their laccase-assisted removal. **Science of The Total Environment**, v. 690, p. 447-459, 2019.

COMISSÃO EUROPEIA (EUROPEAN UNION), 2003. **Directive 2003/74/EC**. Off. J. Eur. Union, L262 of 14.10.2003, 17–21.

HEGER, Z. et al. Exposure to 17 β -Oestradiol induces oxidative stress in the non-oestrogen receptor invertebrate species *Eisenia fetida*. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0145426, 2015.

ISO, **ABNT NBR 11269-2**: Toxicidade do solo - Determinação dos efeitos de poluentes na flora terrestre. Parte 2: Efeitos do solo contaminado na emergência e no crescimento inicial de vegetais superiores. 2014.

ISO, **ABNT NBR. 17512-1**: Qualidade do Solo-Ensaio de fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento-Parte 1: Ensaio com minhocas (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*). 2011.

JOHNSON, A. C.; WILLIAMS, R. J.; MATTHIESSEN, P. The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study. **Science of the Total Environment**, v. 362, n. 1-3, p. 166-178, 2006.

LUZ, G.B., MAFFI, A.S., XAVIER, E.G., CORREA, M.N., GASPERIN, B.G., & BRAUNER, C.C. Induction of lactation in dairy heifers: milk production, inflammatory and metabolic aspects. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 2, p. 371-378, 2020.

NIVA, C. C., BROWN, G. G. (2019). **Ecotoxicologia terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas**. Embrapa Cerrados-Livro científico (ALICE).

RASTETTER, N.; GERHARDT, A. Continuous monitoring of avoidance behaviour with the earthworm *Eisenia fetida*. **Journal of soils and sediments**, v. 18, n. 3, p. 957-967, 2018.

SOUDER, J.P.; GORELICK, D.A. Quantification of estradiol uptake in zebrafish embryos and larvae. **Toxicological Sciences**, v. 158, n. 2, p. 465-474, 2017.

ZHANG, H., SHI, J., LIU, X., ZHAN, X., CHEN, Q. Occurrence and removal of free estrogens, conjugated estrogens, and bisphenol A in manure treatment facilities in East China. **Water research**, v. 58, p. 248-257, 2014.