

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

SUSANA GILAVERTE

TAXA DE EXCREÇÃO, IMPACTO E PERSISTÊNCIA DE RESÍDUO DE
MOXIDECTINA NAS FEZES DE OVINOS NO AMBIENTE

CURITIBA
2014

SUSANA GILAVERTE

**TAXA DE EXCREÇÃO, IMPACTO E PERSISTÊNCIA DE RESÍDUO DE
MOXIDECTINA NAS FEZES DE OVINOS NO AMBIENTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alda Lúcia Gomes Monteiro

CURITIBA

2014

ii

BIOGRAFIA DO AUTOR

Susana Gilaverte, filha de Manuel Timoteo Gilaverte Montull e Leni Maria Dalprá Gilaverte, nasceu em Curitiba, Paraná, no dia 24 de maio de 1983.

Cursou o ensino fundamental e médio no Colégio Madalena Sofia em Curitiba, Paraná. Em março de 2001 ingressou no curso de Tecnologia em Radiologia na Universidade Federal Tecnológica do Paraná e no curso de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná, optando em 2002 por cursar, unicamente, este curso.

Em março de 2003 iniciou estágio voluntário no setor de Ovinos da Universidade Federal do Paraná, atualmente, LAPOC - Laboratório de Produção e Pesquisa em Ovinos e Caprinos da UFPR sob orientação da Prof^a. Dr^a. Alda Lúcia Gomes Monteiro, onde também, em 2004 e 2005 foi bolsista de iniciação científica do CNPq.

Em 2006 realizou estágios voluntários na Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba, na área de ovinos e caprinos, no LABEA - Laboratório de Bem estar animal, na área de bem estar animal, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Carla Molento e, no setor de avicultura da UFPR, sob orientação do Prof. Dr Edson Gonçalves de Oliveira.

Em agosto deste mesmo ano, realizou seu estágio curricular no SIPOC – no Sistema Intensivo de Produção de Ovinos e Caprinos, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz” / ESALQ – USP, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Ivanete Susin, onde em 2007, iniciou o Mestrado no Curso de Pós-Graduação em Ciências, na área de Ciência Animal e Pastagens. Em 2009 recebeu o grau de Mestre.

Em março de 2010 iniciou o Doutorado no Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, tendo como orientadora a Prof^a. Dr^a. Alda Lúcia Gomes Monteiro.

No dia 27 de fevereiro de 2012 submeteu-se à Banca Examinadora de Qualificação e foi aprovada.

No período de março a agosto de 2013 realizou Doutorado Sanduíche no Grupo *Disease Systems Research*, no *Scotland's Rural College*, na Escócia, sob

supervisão de Dr. Jos Houdijk, na área de Nutrition x Parasite interactions e utilização de termo imagens para predizer a infecção endoparasitária em ovelhas periparturientes em diferentes níveis e fontes de proteína metabolizável.

No dia 27 de janeiro de 2014 submeteu-se à Banca Examinadora de pré-defesa e foi aprovada.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela existência e sempre iluminar meus caminhos;

Aos meus pais Manuel Timoteo Gilaverte Montull e Leni Maria Dalprá Gilaverte, às minhas irmãs Aline e Marina e, ao meu afilhado Pedro Henrique pelo incentivo, carinho e exemplo de caráter;

Ao meu cunhado Gustavo pelo incentivo, sempre informando infinitos concursos para eu me inscrever;

Aos outros membros da família, avós, tios e primos pelo carinho e que mesmo sem entender o que é o “doutorado”, torcem pelo meu sucesso;

Ao meu querido e amado noivo Fernando Hentz, pelo carinho, companheirismo e momentos felizes ao longo desta trajetória. Pela ajuda no experimento, desenhamos muitas folhas e colmos, não é?

À minha nova família José Hentz, Wilma Hentz, Fernanda Hentz e Carla Hentz pela acolhida e pelo carinho;

À Universidade Federal do Paraná, pela formação no curso de graduação e de doutorado e, por disponibilizar excelentes professores e ensino de qualidade;

À Prof.^a Dr.^a Alda Lúcia Gomes Monteiro, por ter me aceito no programa, pela orientação, pelos ensinamentos, pela confiança, pela amizade, pelo incentivo em seguir o curso e na condução do projeto;

Ao Prof. Dr. Jair Alves Dionísio pela co-orientação, pelos ensinamentos, pela confiança, pela amizade, pelo otimismo e estar sempre disposto a contribuir;

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Vagas Motta, Prof. Dr. Renato Marques, Prof. Dr. Volnei Pauletti e a Prof.^a Dr.^a Ana Luisa Palhano por estarem sempre dispostos a contribuir;

A Prof.^a Dr.^a Laila Talarico Dias Teixeira, ao Prof. Dr. Cesar Tocanelli e Prof. Dr. Paulo Guimarães pela supervisão nas análises estatísticas;

Ao Prof. Dr. Félix Guillermo Reyes Reyes pelos ensinamentos e parceria no projeto;

Ao Prof. Cesar Henrique Espírito Candal Poli e Pesquisadores Dr. Tony Waterhouse e Dr. Jos Houdijk pela oportunidade de realização e supervisão do doutorado sanduíche;

À minha companheira e pós-graduanda de projeto Msc. Maria Angela Machado Fernandes pela amizade e ajuda nos momentos difíceis e de alegria durante estes anos de convivência;

À Auxiliar de Laboratório de Biologia do Solo do Departamento de Solo e Engenharia Agrícola da UFPR, Cleusa Maria Barth pela paciência e por transmitir seus conhecimentos sobre as análises de microbiologia;

À coordenadora Prof^a. Dr^a. Louise Larissa May De Mio da pós-graduação em Agronomia – Produção Vegetal da UFPR, a secretária Lucimara Antunes e a técnica de laboratório Maria Emília Kudla pela receptividade e dedicação;

Aos alunos de pós-graduação em Entomologia Stela de Almeida, Alexandre Pereira Colavite e Mariana A. Cherman pela colaboração na identificação dos insetos;

À aluna de pós-graduação Michelle DelBianchi e demais alunas do Laboratório de Toxicologia de Alimentos do Departamento de Ciências de Alimentos da FEA-UNICAMP pela colaboração no projeto e pela realização das análises de cromatografia;

Aos estagiários do Laboratório de Produção e Pesquisa em Ovinos e Caprinos (LAPOC) da Universidade Federal do Paraná, Lívia Cristina Vale Fidalgo Saraiva, Viviane Villalba, Mylena Peres, Leonardo Stefano Fernandes Zamoner, Carlos Henrique Kulik, Thailine Scucatto, Daiane Regonato, Carolina Dallagassa, Roger Barros e Guilherme Martins pela amizade e pelas inúmeras vezes que me ajudaram a coletar os insetos, nas análises no laboratório de microbiologia e nas demais atividades realizadas;

Aos pós-doutorandos do Laboratório de Produção e Pesquisa em Ovinos e Caprinos (LAPOC) da Universidade Federal do Paraná, Cláudio José Araújo da Silva e Odilei Rogério Prado pelo exemplo de pesquisadores e amizade;

Aos amigos Edson Ferraz Evaristo de Paula, Wiolene Montanari Nordi, Jordana Andrioli Salgado Espanha, Daniel Junges, Reinaldo Brevilieri, Damaris Ferreira de Souza, Thiago Augusto Cruz, Geisa Costa, Flávia Cristina Sequinel, Thalita Nomura, Melina Xavier e demais que devido à falha de memória não escrevi;

Ao ex-diretor da Fazenda Experimental do Cangüiri da UFPR Prof. Átila Francisco Mogor e funcionários Sérgio, Sr. Vitor, Rampão, Ezequiel e Reginaldo pela ajuda nos trabalhos;

Aos demais colegas do Curso de Pós-graduação, pela convivência durante esses anos;

Aos demais professores do Departamento de Fitotecnia, de Zootecnia e, de Solos e Engenharia Agrícola da UFPR, pelos conhecimentos transmitidos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da Bolsa Ciências sem Fronteiras que possibilitou a realização do Doutorado Sanduíche e, pelo financiamento do projeto;

Ao proprietário Manuel Gilaverte, meu pai, da Cabanha do Espanhol, que disponibilizou materiais e animais para realização dos experimentos;

Enfim, a todos que de forma direta e indireta colaboraram para a realização deste trabalho, e desta etapa da minha vida, meus sinceros agradecimentos.

À minha FAMÍLIA e ao meu NOIVO por todo AMOR, CARINHO, RESPEITO, PACIÊNCIA, APOIO e INCENTIVO concedido durante a minha vida, principalmente nesta jornada, e por estarem sempre presentes em todos os momentos,

DEDICO

Às minhas irmãs Aline, Marina e ao meu afilhado Pedro Henrique com enorme afeto

OFEREÇO

“Quando você conseguir superar problemas graves não se detenha na lembrança dos momentos difíceis, mas na alegria de haver atravessado mais essa prova em sua vida.

Quando sair de um longo tratamento de saúde, não pense no sofrimento que foi necessário enfrentar, mas na benção de Deus que permitiu a cura.

Leve na sua memória, para o resto da vida, as coisas boas que surgiram nas dificuldades.

Elas serão uma prova de sua capacidade e lhe darão confiança diante de qualquer obstáculo.

Uns queriam o supérfluo; outros, apenas o necessário.

Há dois tipos de sabedoria: a inferior e a superior.

A sabedoria inferior é dada pelo quanto uma pessoa sabe e a superior é dada pelo quanto ela tem consciência de que não sabe.

Tenha a sabedoria superior. Seja um eterno aprendiz na escola da vida.

A sabedoria superior tolera, a inferior julga; a superior alivia, a inferior culpa; a superior perdoa, a inferior condena. Tem coisas que o coração só fala para quem sabe escutar!”

Chico Xavier

“Seu trabalho vai preencher boa parte da sua vida e a única maneira de ser verdadeiramente satisfeito é fazer o que acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um ótimo trabalho é amar o que você faz.”

Steve Jobs

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xvii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xxi
RESUMO.....	xxii
ABSTRACT.....	xxiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS.....	4
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
1.1 FAUNA EDÁFICA E IMPACTO AMBIENTAL DO RESÍDUO DE MOXIDECTINA PRESENTE NAS FEZES DE RUMINANTES.....	5
1.1.1 Impacto no solo da Moxidectina excretada nas fezes.....	5
1.1.1.1 Fauna do solo.....	5
1.1.1.2 Excreção e a importância da fauna edáfica.....	8
1.1.2 Estrutura química e modo de ação da moxidectina.....	9
1.1.3 Impacto ambiental do resíduo de lactonas macrocíclicas excretado nas fezes.....	10
1.1.3.1 Persistência no ambiente.....	10
1.1.3.2 Impacto sobre a fauna coprófaga.....	11
REFERÊNCIAS.....	14
2 PERFIL DE EXCREÇÃO VIA FEZES E PERSISTÊNCIA AMBIENTAL DO ANTI-HELMÍNTICO MOXIDECTINA APLICADO EM OVINOS.....	21
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
2.1 INTRODUÇÃO.....	23
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.2.1 Solventes e reagentes.....	25
2.2.2 Preparo de soluções.....	26
2.2.3 Amostras branco de fezes de cordeiros.....	26
2.2.4 Equipamentos.....	26
2.2.5 Preparo de amostras.....	27

2.2.6	Condições do Sistema UPLC-MS/MS QqQ.....	28
2.2.7	Validação do método analítico.....	29
2.2.8	Ensaio com os animais.....	30
2.2.9	Avaliação da cinética de excreção da MOX pelas fezes.....	31
2.2.10	Persistência da MOX nas fezes expostas ao ambiente.....	32
2.2.11	Análise estatística.....	34
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
2.3.1	Preparo da amostra.....	35
2.3.2	Validação do método analítico.....	35
2.3.3	Cinética de excreção de MOX via fezes.....	39
2.3.4	Persistência da MOX presente nas fezes de cordeiros no ambiente.....	42
2.4	CONCLUSÕES.....	44
	REFERÊNCIAS.....	46
3	IMPACTO DA MOXIDECTINA ELIMINADA NAS FEZES DE OVINOS SOBRE A FAUNA COPRÓFAGA E A DECOMPOSIÇÃO DO BOLO FECAL EM PASTAGENS TÍPICAS DO SUL DO BRASIL.....	50
	RESUMO.....	50
	ABSTRACT.....	51
3.1	INTRODUÇÃO.....	52
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.2.1	Delineamento Experimental.....	54
3.2.2	Decomposição dos bolos fecais.....	56
3.2.3	Análise Estatística.....	56
3.3	RESULTADOS.....	57
3.3.1	Fauna Coprófaga.....	57
3.3.2	Decomposição dos bolos fecais.....	63
3.4	DISCUSSÃO.....	68
3.4.1	Fauna Coprófaga.....	68
3.4.2	Decomposição dos bolos fecais.....	71
3.5	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73

4 IMPACTO DO RESÍDUO DE MOXIDECTINA PRESENTE NAS FEZES DE OVINOS UTILIZADAS COMO ADUBO ORGÂNICO SOBRE A MICROBIOLOGIA DO SOLO E O CRESCIMENTO DO SORGO.....	78
RESUMO.....	78
ABSTRACT.....	79
4.1 INTRODUÇÃO	80
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	83
4.2.1 Contaminação das fezes.....	84
4.2.2 Avaliações microbiológicas.....	85
4.2.3 Densidade populacional de micro-organismos.....	85
4.2.4 Respiração microbiana do solo ou respiração basal (RB).....	86
4.2.5 Carbono da biomassa microbiana.....	86
4.2.6 Quociente metabólico.....	87
4.2.7 Nitrato e amônio do solo (mg kg^{-1}).....	87
4.2.8 Crescimento do sorgo.....	87
4.2.9 Estatística experimental.....	89
4.3 RESULTADOS.....	89
4.4 DISCUSSÃO.....	96
4.5 CONCLUSÃO.....	99
REFERÊNCIAS.....	100
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Composição da fase móvel durante a corrida cromatográfica.....	28
TABELA 2 -	Parâmetros de validação do método desenvolvido.....	39
TABELA 3 -	Parâmetros da cinética de eliminação da moxidectina (MOX) pelas fezes de cordeiro, após administração subcutânea de 0,2 mg kg ⁻¹ de peso corpóreo (n = 7).....	41
TABELA 4 -	Efeitos da moxidectina sobre o número de dípteros nas fezes de carneiros com ou sem cobertura contra a chuva, utilizando a metodologia de coleta puçá, entre 19 de março e 18 de junho de 2012, PR, Brasil.....	58
TABELA 5 -	Efeito da moxidectina nas fezes de carneiros sobre o número de Díptera com ou sem a cobertura contra a chuva, utilizando a metodologia de coleta pitfall, entre 19 de março e 18 de junho de 2012, PR, Brasil.....	60
TABELA 6 -	Efeito da moxidectina nas fezes de carneiros sobre o número de Hymenoptera com ou sem cobertura contra a chuva, utilizando a metodologia de coleta pitfall ou contagem direta, entre 19 de março e 18 de junho de 2012, PR, Brasil.....	61
TABELA 7 -	Efeito da moxidectina nas fezes de carneiros sobre o número de Coleoptera, com ou sem cobertura contra a chuva, utilizando a metodologia de coleta pitfall ou contagem direta, entre 19 de março e 18 de junho de 2012, PR, Brasil.....	62
TABELA 8 -	Nitrogênio (%), carbono (%) and peso seco das fezes (g) de bolos fecais de carneiros que não foram desverminados, Controle, e desverminados com Moxidectina (Cydectin®), com ou sem cobertura contra a chuva.....	64
TABELA 9 -	Densidade populacional (UFC/g de solo) de bactérias, actinobactérias e fungos em solo adubado com fezes de ovinos contendo níveis crescentes de resíduo de moxidectina, até os 28 dias após contaminação.....	90

TABELA 10 -	Densidade populacional (UFC/g de solo) de bactérias, actinobactérias e fungos em solo adubado com fezes de ovinos contendo níveis crescentes de resíduo de moxidectina.....	91
TABELA 11 -	Respiração ($\mu\text{gC-CO}_2\cdot\text{g}^{-1}$ de solo) e Biomassa ($\text{mgC-CO}_2\cdot\text{g}^{-1}$ de solo) microbiana em solo adubado com fezes de ovinos contendo níveis crescentes de resíduo de moxidectina.....	93
TABELA 12 -	Mensuração do crescimento do sorgo cultivado em solo adubado com esterco de ovino contaminado com níveis crescentes (0, 75, 300, 600, 1500 e 3000 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de moxidectina).....	95
TABELA 13 -	Altura final do sorgo cultivado em solo adubado com esterco de ovino contaminado com níveis crescentes (0, 75, 300, 600, 1500 e 3000 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de moxidectina).....	95

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Fluxograma do preparo da amostra para análise das fezes de cordeiro.....	27
FIGURA 2 -	Condições metereológicas durante o período experimental, de 19 de março a 18 de junho de 2012, PR, Brasil.....	32
FIGURA 3 -	Condições metereológicas durante o período experimental, de 19 de março a 18 de junho de 2012, PR, Brasil.....	33
FIGURA 4 -	Cromatograma da matriz branco de fezes fortificada com moxidectina (200 ng g ⁻¹) e emamectina (40 ng.g ⁻¹).....	36
FIGURA 5 -	Curvas analíticas da moxidectina (MOX) no solvente (ACN) (A) e extrato (B) e matriz (C) fortificadas.....	37
FIGURA 6 -	Perfil da concentração de moxidectina nas fezes de cordeiros <i>versus</i> tempo, após a administração subcutânea de 0,2 mg.kg ⁻¹ de peso corpóreo (n=7).....	40
FIGURA 7 -	As letras maiúsculas se referem à comparação entre os tratamentos e as letras minúsculas se referem à comparação entre os dias de exposição ao ambiente pelo teste de Tukey (P<0,05).....	42
FIGURA 8 -	Condições metereológicas durante o período experimental, 19 de março a 18 de junho de 2012, PR, Brasil.....	54
FIGURA 9 -	Condições metereológicas durante o período experimental, de 19 de março a 18 de junho de 2012, PR, Brasil.....	54
FIGURA 10 -	Decomposição de bolos fecais de 200 g de carneiros desverminados com moxidectina (Cydectin®) ou não, com ou sem cobertura contra a chuva, 19 de março a 18 de junho de 2012, Curitiba, PR. Brasil.....	65
FIGURA 11 -	Porcentagens de nitrogênio de bolos fecais de 200 g de carneiros desverminados com moxidectina (Cydectin®) ou não, com ou sem cobertura contra a chuva, 19 de março a 18 de junho de 2012, Curitiba, PR. Brasil.....	66

FIGURA 12 -	Porcentagens de carbono de bolos fecais de 200 g de carneiros desverminados com moxidectina (Cydectin®) ou não, com ou sem cobertura contra a chuva, 19 de março a 18 de junho de 2012, Curitiba, PR, Brasil.....	67
FIGURA 13 -	Temperaturas máxima e mínima (°C) diárias na casa de vegetação durante o período experimental, 25 de set a 16 de out de 2012, Curitiba, PR, Brasil.....	85
FIGURA 14 -	Temperaturas máxima e mínima (°C) diárias na casa de vegetação durante o período de crescimento do sorgo, 25 de set a 16 de out de 2012, Curitiba, PR, Brasil.....	88
FIGURA 15 -	Análise de regressão entre a respiração e a biomassa microbiana em solo adubado com fezes de ovinos contendo níveis crescentes de resíduo de moxidectina.....	94
FIGURA 16 -	Concentração de Amônio e Nitrato (ng.g ⁻¹ de solo) em solo adubado com fezes de ovinos contendo níveis crescentes de resíduo de moxidectina.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g C-CO}_2\text{.g}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{.semana}^{-1}$	Micrograma de carbono ligado ao gás carbônico por grama de solo seco por semana
$\mu\text{g.kg}^{-1}$	Micrograma por kilograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
ABIEC	<i>Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne</i>
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	<i>Area under curve</i>
AVM	Avermectin
BMS	Biomassa microbiana do solo
C	Carbono
C:N	Relação entre o carbono e o nitrogênio
Ca	Cálcio
CaCl_2	Cloreto de cálcio
CAST	<i>Current Agricultural Science and Technology</i>
Cfb	Clima temperado úmido com verão temperado
Cmáx	Concentração máxima
$\text{cmol}_c\text{.dm}^{-3}$	centimol de carga por decímetro cúbico
CO_2	Gás carbônico
COMTRADE	<i>United Nations Commodity Trade Statistics Database</i>
CR	Capacidade de retenção de água
CRIS	Calibração da respiração induzida pelo substrato
Cu	Cobre
CV	Coefficiente de variação
d	Day ou dia
DM	Dry matter
DP	Desvio padrão
EC	Comunidade Europeia

EMA	Emamectina
F	Fisher
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Ferro
FM	Fase móvel
g	grama
g.dm^{-3}	Grama por decímetro cúbico
g.mol^{-1}	Grama por mol
GABA	Ácido γ -aminobutírico
h	Hour ou hora
$\text{H}^+ + \text{Al}^{+3}$	Acidez potencial
H_2	Gás hidrogênio
H_2O	Água
H_2S	Sulfeto de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	<i>High Performance/Pressure Liquide Chromatography</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
K	Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
Ke	Taxa de eliminação constante na fase terminal
kg	quilograma
$K_{o/w}$	<i>Coeficiente de partição octanol-água</i>
KV	Kilovolt
L	litro
LAPOC	Laboratório de Produção e Pesquisa em Ovinos e Caprinos
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
m/z	<i>Mass-to-charge ratio</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Mg	Magnésio
mg C-CO ₂ g s ⁻¹ h ⁻¹	Miligrama de Carbono ligado ao gás carbônico por grama de solo seco por hora
mg kg ⁻¹	Miligrama por quilograma
Mg.dm ⁻³	Miligrama por decímetro cúbico
Mg.mL ⁻¹	Miligramas por mililitro
mL	mililitro
mL.min ⁻¹	Mililitro por minuto
mm	milímetro
mM	Milimolar
Mn	Manganês
MOX	moxidectina
MRM	Monitoramento de reação múltipla
MS	Matéria seca
MXD	Moxidectin
N	Nitrogênio
N	Normalidade
NaOH	Hidróxido de sódio
ng.g ⁻¹	Nanograma por grama
Ng.mL ⁻¹	Nanograma por mililitro
NH ₄	Amônio
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NRC	<i>Nutrition ruminant council</i>
°C	Grau Celsius
P	Fósforo
PB	Proteína bruta
PR	Paraná
PTFE	Politetrafluoretileno
PVDF	Pilivinilideno
qCO ₂	Quociente metabólico
r	Coeficiente de correlação linear
RB	Respiração basal

RIS	Respiração induzida pelo substrato
SB	Soma de Bases
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
SMP	Método de análise e correção de acidez do solo. A sigla que identificam o método se refere aos criadores do método: Shoemaker, Mac lean e Pratt.
SO ₄ ²⁻	Sulfato
t	Estatística t
T	Capacidade de troca de cátions a pH 7,0
T _{1/2}	Tempo de eliminação de meia vida
T _{máx}	Tempo para alcançar C _{máx}
UFC.g ⁻¹	Unidades Formadoras de Colônia por grama
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UPLC-MS/MS	<i>Ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry/ mass spectrometry</i>
V%	Porcentagem de saturação por bases
Zn	Zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

© - Copyright

® - Marca registrada

RESUMO

A endoparasitose é a enfermidade mais frequente na ovinocultura, sendo a utilização de anti-helmínticos o principal método de controle. A principal via de excreção destes fármacos é pelas fezes, o que pode significar danos ao ambiente. Este trabalho foi dividido em quatro experimentos. No primeiro experimento o objetivo foi avaliar o perfil de excreção da moxidectina 1 % injetável via subcutânea (Cydectin® NF, Fort Dodge Saúde Animal) nas fezes de cordeiros desmamados, por meio da curva de excreção do resíduo ao longo do tempo (0 a 56 dias após a aplicação), bem como sua persistência no ambiente por 88 dias. Para tanto, foi desenvolvido e validado um método analítico para determinação da moxidectina nas fezes por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). Nos segundo e terceiro experimentos objetivou-se avaliar o impacto ambiental da moxidectina, por meio da degradação e da toxicidade desta molécula sobre a fauna coprófaga por 88 dias, e seu efeito sobre a densidade populacional e atividade de micro-organismos do solo. No quarto experimento buscou-se verificar as possíveis consequências da moxidectina no ambiente, ao avaliar o crescimento do sorgo granífero (*Sorghum vulgare* Pers.). Sete cordeiros da raça Suffolk com média de peso corporal de $36,06 \pm 3,23$ kg foram dosificados via subcutânea com $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ de peso corporal, em uma única dose, para a determinação da curva de excreção. As coletas de fezes foram realizadas após 6, 12, 18, 24, 30 e 36 horas e 2, 3, 5, 9, 14, 21, 28, 35 e 42 dias da aplicação da MOX. Para avaliar a persistência da moxidectina no ambiente, foram selecionados treze carneiros das raças Suffolk e Dorper com $76,43 \pm 34,24$ kg e, separados em dois grupos, controle e contaminado, para este grupo foi administrada uma única dose (Cydectin®), via subcutânea, de $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ de peso corpóreo. Para ambos os grupos, as fezes foram coletadas ao mesmo tempo, no pico de excreção (36 a 60 h) da moxidectina para o tratamento contaminado, por meio de bolsas, e expostas ao ambiente com cobertura contra a chuva ou não, por 88 dias. Bolos fecais (200 g) do grupo controle ou do contaminado foram distribuídos aleatoriamente no ambiente isolado por mais de seis meses, em cinco repetições, para determinação da decomposição das fezes em g de peso seco, % carbono, % nitrogênio, relação C:N, a concentração de moxidectina, nesta matriz e, o efeito deste fármaco na fauna coprófaga. Os dípteros foram coletados por meio do puçá duas vezes ao dia até o 10º dia, dias alternados até o 20º dia, a cada 4 dias até o 40º dia e a cada 8 dias até 88º dia experimental. A metodologia de coleta do tipo armadilha de queda (*pitfall*) foi utilizada para coleta nos 10 primeiros dias, das famílias Diptera, Hymenoptera e Coleoptera. A coleta direta da família Coleoptera foi realizada 4, 8, 12, 24, 36, 60 e 88 dias de exposição ao ambiente. Para a determinação do impacto da moxidectina sobre a microbiologia do solo, foram utilizados 36 vasos de polietileno, em casa de vegetação, contendo em média $3176,84 \pm 97,72$ g de solo seco, com $80,70 \pm 2,85\%$ de massa seca e 80 g de fezes secas, com $40,32 \pm 1,06\%$ de MS, contaminadas em laboratório com níveis crescentes (0, 75, 300, 600, 1500 e 3000 ng.g^{-1} de fezes secas) de moxidectina. A umidade do solo + fezes foi ajustada para capacidade de campo de 40%, sendo que diariamente os vasos eram pesados e adicionava-se água para manter a umidade inicial. Foram realizadas coletas semanais (0, 7, 14, 21, 28 e 56 dias) para a contagem de bactérias, fungos e actinobactérias em diluições sucessivas em placas de Petri, biomassa e respiração microbiana. Aos 56 dias determinaram-se os teores de amônio e nitrato no solo. Aos 63 dias, o peso dos

vasos foi uniformizado em 2 kg, sendo semeadas cinco sementes de sorgo granífero (*Sorghum vulgare* Pers.). Três plantas foram selecionadas para mensurações semanais de altura até os 28 dias de crescimento. Posteriormente, as plantas foram separadas em parte aérea e raiz para determinação da área (cm²) foliar e do colmo e, da massa seca da parte aérea e da raiz. O método analítico desenvolvido foi validado apresentando exatidão entre 80-120% e valores de precisão intra e inter-dias entre 6,24 - 9,44 %. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) determinados foram de 3,08 ng.g⁻¹ e 5,14 ng.g⁻¹, respectivamente. As concentrações de moxidectina nas fezes apresentaram valores de C_{máx} 22,74 ng g⁻¹, no T_{máx} de 39,92 h. O valor da AUC foi de 13292,68 ng.g⁻¹.h. A concentração verificada de 35,94 ± 2,96 e 38,50 ± 4,71 ng.g⁻¹, para ambos os tratamentos com ou sem cobertura, respectivamente, foi semelhante à concentração obtida no estudo da curva de excreção. O isolamento ou não do bolo fecal contra a chuva não interferiu na degradabilidade ou percolação da molécula, pois a concentração aos 88 dias foi de 28,07 ± 5,90 e 29,22 ± 5,31 ng.g⁻¹, apresentando uma degradabilidade de 17,61% e 27,14%, respectivamente. A molécula de MOX apresentou alta sorção nas fezes. O resíduo de moxidectina presente nas fezes não afetou o número de indivíduos coprófagos. Entretanto, a degradação das fezes expostas ao ambiente diferiu entre os tratamentos, sendo que para o tratamento controle o peso seco foi superior em comparação com o tratamento como moxidectina. Para ambos os tratamentos, a cobertura contra a chuva reduziu a decomposição das fezes. As porcentagens de nitrogênio e carbono não diferiram entre os tratamentos com ou sem cobertura. Em contra partida, nos bolos fecais do tratamento moxidectina foi observada maior % de nitrogênio e menor % de carbono que o tratamento controle. A densidade populacional de micro-organismos do solo não foi afetada pelos níveis crescentes de moxidectina. Entretanto, o resíduo proporcionou redução linear na atividade respiratória e biomassa microbiana. O processo de amonificação não foi afetado pela presença de moxidectina, contudo a produção de nitrato foi reduzida a 50%, independente do nível utilizado. Com relação ao crescimento do sorgo, a parte área não foi afetada pela presença do fármaco, entretanto, a raiz apresentou redução na massa seca de plantas cultivadas em doses de 3000 ng.g⁻¹. A molécula de moxidectina apresenta alta sorção nas fezes e baixa degradabilidade no ambiente. Esse fármaco presente no bolo fecal de ovinos não apresenta impacto para a fauna coprófaga, nas condições avaliadas. De forma que, aumentam a atratividade destes indivíduos, promovendo a maior decomposição das fezes. Em contra partida, níveis crescentes de moxidectina nas fezes misturadas ao solo utilizadas como adubo orgânico prejudicam linearmente a atividade microbiana, refletindo no crescimento da raiz do sorgo no estágio inicial de crescimento cultivado neste solo.

Palavras-chave: Crescimento do sorgo. Fauna coprófaga. Impacto ambiental. Moxidectina. Microbiologia do solo. Ovinos.

ABSTRACT

The endoparasitose is the most common disease in sheep production, with the use of anthelmintics main control method. The main route of excretion is the feces of these drugs, meaning that they can bring harm to the environment. This work was divided in to four experiments. The first experiment objective was to assess the kinetic of excretion of moxidectin (MDX) molecule in feces of lamb after subcutaneous administration. To that end, we developed and validated an analytical method for determination of MDX in feces by liquid chromatography ultra-high pressure and quantification by mass spectrometry (LC-MS/MS). The second and third experiment evaluated the environment impact of moxidectin through degradation and toxicity, on dung fauna (Diptera, Hymenoptera and Coleoptera) over 88 days, and the effect on population density of soil microbiology and its activity. In the fourth experiment, it was verified possible consequences of MDX in the environment, to assess the growth of grain sorghum (*Sorghum vulgare* Pers.). Seven Suffolk lambs with $36.06 \pm 3,23$ kg body weight were dosed subcutaneously with 0.2 mg kg^{-1} body weight in a single dose, whose fecal samples were made up to 42 days after application. To assess the persistence of moxidectin residues in the environment, thirteen Suffolk and Dorper with 76.43 ± 34.24 kg, whose feces were collected at maximum time of excretion, through bags, and exposed to the environment were selected coverage against the rain or not, over 88 days. Thirteen rams were separated in 2 groups, untreated and MDX. The latter group was administered one single dose of MDX (Cydectin®) at a rate of 0.2 mg. kg^{-1} body weight. Feces were collected on maximum time of excretion at 36 h to 60 h after application using collection bags. Two hundred grams of fecal pats of control or contamination sheep with five replicates for each treatment were placed in a field not grazed for more than 6 month with or without coverage against rain. Diptera were collected using an insect net twice a day until day 10, every other day from day 11 to day 20, every 4 days from 21 until day 40 and every 8 days thereafter. The pitfall methodology was used to dung Diptera, Hymenoptera and Coleoptera collected three pitfalls in each replicated until 10 first days. Dung Coleoptera were collected and MXD concentration were analysed in fecal paths after 0, 4, 8, 12, 24, 36, 60 and 88 days of field exposure. In addition, dung was analyzed for dry matter (DM), carbon (C) and nitrogen (N) percentage. Thirty-six polyethylene pots in a greenhouse, containing on 3176.84 ± 97.72 g dry soil, with $80.70 \pm 2.85\%$ DM and 80 g of dry feces with com 40.32 ± 1.06 % DM, contaminated in the laboratory with increasing levels (0, 75, 300, 600, 1500 and 3000 ng.g^{-1} dry feces) of moxidectin. Soil moisture was adjusted to + feces field capacity of 40%, and the vessels were weighed daily and added to water to maintain the initial moisture. They were collected weekly (0, 7, 14, 21, 28 and 63 days) soil for counting bacteria, fungi and actinomycetes in successive dilutions in Petri dishes, biomass and microbial respiration. For 63 days the concentrations of ammonium and nitrate in the soil has been determined. The analytical method was validated showing 80-120% accuracy and precision values of intra and inter-day between 6.24% - 9.44%. The detection limits (LOD) and quantification (LOQ) were determined as 3.08 ng.g^{-1} and 5.14 ng.g^{-1} , respectively. The results of the validation parameters showed that this method was suitable to determine the presence of MOX in lamb serum. Moxidectin concentrations in the feces showed C_{max} as $22,73 \text{ ng g}^{-1}$, in T_{max} of 39,92 h. The value of AUC was $13292 \text{ ng h.g}^{-1}$. The observed concentration of 35.94 ± 2.96 and $38.50 \pm 4.71 \text{ ng.g}^{-1}$, for both treatments with or

without coverage against rain, respectively, were similar to the concentration obtained in the study of excretion curve. Fecal isolation or not of the rain did not affect the degradability or molecule percolation, since the concentration over 88 days was 28.07 ± 5.90 and $29.22 \pm 5.31 \text{ ng.g}^{-1}$, with 17,61% and 27,14% degradability, respectively. The MOX molecule showed high adsorption in the faeces. Moxidectin treated faeces did not reduce fauna dung numbers of any species collected. However, control faeces degraded slower than MXD treated faeces. For both, the treatments covered against rain decreased dung decomposition. Rain coverage did not affect N and C percentages, independent of MXD treatments. However, MXD treated dung pats had greater N and lower C percentages than untreated dung pats. The population density of micro-organisms in the soil was not affected by increasing levels of moxidectin. However, residue provided linear reduction in microbial activity (respiration and biomass). The ammonification process were not affected by the presence of moxidectin, however, nitrate production was reduced by half, regardless of the level used.

Key-words: Dung fauna. Environment impact. Moxidectin. Sheep. Soil microbiology. Sorghum growth.

INTRODUÇÃO GERAL

A ovinocultura de corte no país vem se desenvolvendo de forma gradativa, estabelecendo-se em regiões como centro-oeste e norte do país, que não possuíam, em anos anteriores, a tradição nesta atividade. Mesmo com o aumento da produção nacional, existe um déficit de carne ovina no mercado, visto que a importação de carne ovina passou de US\$ 6 milhões para mais de US\$ 34 milhões (COMTRADE, 2011). Isso demonstra que existe um mercado interno ávido com oportunidades reais para os produtores brasileiros desenvolverem a cadeia produtiva de ovinos e assim ocupar de forma mais racional as imensas áreas de pasto disponíveis no país.

As infecções por nematóides limitam a produtividade dos animais, reduzindo o ganho de peso e a eficiência alimentar (AMARANTE & SALES, 2007), além de comprometer o desempenho reprodutivo e o sistema imunológico (COSTA et al., 2004). Na tentativa de controlar este problema, utiliza-se quase que exclusivamente anti-helmínticos, muitas vezes, de forma indiscriminada. Em pequenos ruminantes, a falta de conhecimento faz com que sejam realizados esquemas de vermifugação com intervalos de 30 dias ou até, 15 dias, e muitas vezes com alternâncias de princípios ativos. Estes esquemas baseados exclusivamente na ação do vermífugo elevam o custo e podem levar ao insucesso da produção, pois proporcionam a rápida seleção de parasitos resistentes aos vários princípios ativos (AMARANTE & SALES, 2007).

Em função dessa baixa eficácia de vários princípios ativos utilizados no Brasil - tais como a ivermectina, que já se apresenta ineficaz nos rebanhos ovinos do Sul do Brasil, mesmo quando aplicada em até quatro vezes a dose recomendada - nos últimos vinte anos outras moléculas começaram a ser utilizadas. A moxidectina, por exemplo, teve em 1990 a sua primeira forma farmacêutica colocada no mercado (McKELLAR et al., 1996). Na Universidade Federal do Paraná, a partir de 2002, em função da elevada resistência às avermectinas e aos benzimidazóis, adotou-se o uso de uma milbemicina – moxidectina- e de um composto substituto fenólico – nitroxinil para o controle das parasitoses. Esses mesmos princípios têm sido adotados pelos produtores paranaenses, especialmente no caso da moxidectina, pelos produtores das Cooperativas de produtores de carne do Estado do PR. O uso

da moxidectina tem sido constatado nos últimos dez anos em vários outros Estados brasileiros (São Paulo, Minas Gerais, e Rio Grande do Sul) (MOLENTO, 2009). Devido à representatividade da utilização desse fármaco e a sua persistência de ação aos helmínticos, torna-se necessário avaliar os seus níveis de resíduos nos produtos de origem animal, seu período de carência, bem como a contaminação prolongada ao ambiente, visto que a eliminação deste fármaco (50 a 90 %) é principalmente via fezes e urina (MULROY, 2001), e conseqüentemente, podem afetar a população de seres vivos que vive permanentemente, ou que passa um ou mais ciclos de vida no solo. Estes organismos desempenham a importante função de decompor as fezes, incorporar os nutrientes e realizar o controle biológico.

As características físicas, deste fármaco, tais como alto peso molecular, insolubilidade à água, solubilidade em compostos orgânicos e elevada lipofilia, permitem uma ampla distribuição tissular e prolongada permanência na circulação sistêmica, devido à sua deposição no tecido adiposo.

Objetivou-se com o presente trabalho determinar o período de excreção da moxidectina (Cydectin® NF, Fort Dodge Saúde Animal) nas fezes de cordeiros desmamados, por meio da curva de excreção do resíduo ao longo do tempo (0 a 42 dias após a aplicação). Para tanto, foi desenvolvido e validado um método analítico para determinação da moxidectina nas fezes por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Objetivou-se também, avaliar a persistência deste resíduo no ambiente, seu efeito sobre a microbiologia do solo, fauna coprófaga e o crescimento do sorgo granífero (*Sorghum vulgare* Pers.).

A tese foi elaborada na forma de capítulos. Os capítulos 1, 2, 3, 4 foram redigidos com base nas normas para redação e editoração das Revistas Científicas a serem submetidos.

O Capítulo 1 inclui a Revisão de Literatura intitulada **Fauna edáfica e impacto ambiental do resíduo de moxidectina presente nas fezes de ruminantes**, publicada na Revista Brasileira de Agrociência (*Current Agricultural Science and Technology - CAST*).

O Capítulo 2 é intitulado **Taxa de excreção via fezes e persistência no ambiente da moxidectina aplicada em ovinos**, que será publicada na Revista *The Veterinary* e teve por objetivos determinar o tempo de excreção, bem como as concentrações eliminadas, do resíduo de moxidectina 1% nas fezes de cordeiro

após a sua aplicação subcutânea. Adicionalmente, avaliou-se a persistência no ambiente do resíduo deste anti-helmíntico eliminado nas fezes. Para tanto, foi desenvolvido e validado um método analítico para determinação da moxidectina nas fezes por cromatografia líquida de alta eficiência e quantificação por espectrometria de massas (LC-MS/MS).

O Capítulo 3 é intitulado **Impacto da moxidectina eliminada nas fezes de ovinos sobre a fauna coprófaga e a decomposição do bolo fecal em pastagens típicas do Sul do Brasil**, que será publicada na Revista *Veterinary Parasitology* e teve por objetivos avaliar a degradação e a toxicidade à fauna coprófaga (Diptera, Hymenoptera and Coleoptera) até 88 dias de exposição ao ambiente, de bolos fecais com a presença de moxidectina, em pastagem no Sul do Brasil.

O Capítulo 4 é intitulado **Impacto do resíduo de moxidectina, sobre a microbiologia do solo e no crescimento do sorgo, presente nas fezes de ovinos utilizadas como adubo orgânico**, que será publicada na Revista *Veterinary Parasitology* e teve por objetivos avaliar o impacto do resíduo de moxidectina, presente nas fezes de ovinos utilizadas como adubo orgânico, sobre a microbiologia do solo, bem como avaliar o efeito no crescimento do sorgo.

Finalizando a tese, são apresentadas as **Considerações Finais**, em que os resultados obtidos são discutidos de forma resumida, apresentando-se sugestões.

REFERÊNCIAS

AMARANTE, A.F.T.; SALES, R. de O. Controle de endoparasitoses dos ovinos: uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v. 1, p.14-36, 2007.

COSTA, A.J. et al. Avaliação comparativa da ação anti-helmíntica e do desenvolvimento ponderal de bezerros tratados com diferentes avermectinas de longa ação. **A Hora Veterinária**, v.24, n.139, p.31-34, 2004.

MULROY, A. Monitoring and Analysis of Water and Wastes. **Water Environment Technology**, v. 13, n. 2, p. 32-36, 2001.

McKELLAR, Q.A.; BENCHAOUI, H. Avermectins and milbemicycins. **Journal Veterinary Pharmacology Therapy**, v.19, p. 331-351, 1996.

MOLENTO, M.B. Resistência Parasitária. In: CAVALCANTE, A.C.R.; VIEIRA, L. da S. et al. Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009, 603p.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 FAUNA EDÁFICA E IMPACTO AMBIENTAL DO RESÍDUO DE MOXIDECTINA PRESENTE NAS FEZES DE RUMINANTES

1.1.1 Impacto no solo da Moxidectina excretada nas fezes

1.1.1.1 Fauna do solo

A fauna do solo é a comunidade de invertebrados que vive permanentemente ou que passa um ou mais ciclos de vida no solo. Esses invertebrados variam muito em tamanho e diâmetro, o que lhes confere habilidade diferenciada na sua estratégia de alimentação e adaptação ao habitat (AQUINO & ASSIS, 2005).

A microfauna compreende invertebrados de diâmetro do corpo inferior a 100 μm , incluindo os protozoários e nematoides. Esses animais influenciam as transformações de serrapilheira por se alimentarem de raízes, fungos e bactérias, o que faz com que tenham importante papel na regulação da matéria orgânica (SWIFT et al., 1979).

A mesofauna compreende invertebrados de tamanho médio (100 μm – 4 mm) que se movimentam em fissuras, poros e na interface do solo, como por exemplo, os ácaros e colêmbolos, incluindo os proturos, dipluros, tisanuros, e pequenos insetos (GIRACCA et al., 2003). Atuam como transformadores e micropredadores, se alimentando de fungos e bactérias, e predam outros animais do solo. Desta forma, esse grupo é importante na regulação da decomposição da matéria orgânica ao promoverem a remoção seletiva de microrganismos (MOORE & WALTER, 1988). Esses animais habitam os espaços porosos do solo e não são capazes de criar sua própria galeria, sendo afetados pela compactação do solo (HEISLER & KAISER, 1995).

A macrofauna é composta pelos organismos de maior diâmetro (2 mm – 20 mm), incluem-se minhocas, coleópteros em estado larval e adulto, centopéias, cupins, formigas, piolhos de cobra (milipéias), tatuzinhos e aracnídeos (LAVELLE & SPAIN, 2001). Estes têm o corpo em tamanho suficiente para romper as estruturas dos horizontes minerais e orgânicos do solo ao se alimentar, movimentar e construir galerias no solo (ANDERSON, 1988). As minhocas influenciam tanto na porosidade do solo quanto nas relações de nutrientes por meio da formação de túneis e da ingestão de minerais e matéria orgânica, além de auxiliarem na regulação das populações dos organismos do solo em escalas espaciais menores: mesofauna e microfauna.

Os miríapodos (gongolos e lacraias), por meio da cabeça e de seus diversos pés, constroem seus caminhos entre a vegetação e outros habitats não disponíveis à micro e mesofauna (HOPKIN & READ, 1992). Os cupins, as formigas e os besouros influenciam ou mediam a porosidade e a textura do solo pela formação de túneis, da ingestão e transporte de solo e pela construção de galerias. Realizam a ciclagem de nutrientes pelo transporte, fragmentação e digestão da matéria orgânica (MARTÍNEZ & LUMARET, 2006).

Os invertebrados classificados como engenheiros do ecossistema constroem grandes e resistentes estruturas organominerais que podem persistir por longo período de tempo (de meses a anos) e que afetam profundamente o ambiente para os organismos menores. Esses invertebrados desenvolvem relações mutualísticas com microrganismos em seu trato digestivo (rúmen interno) e nas estruturas que constroem (rúmen externo). Esse grupo inclui minhocas, formigas e cupins (AQUINO & ASSIS, 2005).

A macrofauna invertebrada do solo desempenha um papel chave no funcionamento do ecossistema, pois ocupa diversos níveis tróficos dentro da cadeia alimentar do solo e afeta a produção primária de maneira direta e indireta. Ela absorve e enriquece o solo com nutrientes essenciais por meio das cadeias alimentares (resíduos de plantas, micro-organismos, húmus e água) (YIN et al., 2010). As populações e atividade de microrganismos responsáveis pelos processos de mineralização e humificação e, em consequência, exerce influência sobre o ciclo de matéria orgânica e a disponibilidade de nutrientes assimiláveis pelas plantas (DECÄENS et al., 2003). Além disso, após a morte, os cadáveres da macrofauna

são decompostos por micro-organismos do solo que disponibilizam nutrientes para as plantas (YIN et al., 2007b). O enriquecimento de nutrientes no solo pela fauna é diferente. O enriquecimento para Cu, Zn e Mn para oligoquetas, quilópodes foi Zn > Cu > Mn e Cu > Zn > Mn para diplópodes (YIN et al., 2007a). Entretanto, não houve diferença entre a mobilização e o catabolismo pela fauna do solo em relação aos elementos N, P, K, Ca, Mg e Fe (YIN et al., 2006). Ca e Mg no solo são principalmente enriquecidos pelos diploides e o Fe pelos oligoquetas, diploides e quilópodes (SONG et al., 2008).

Os decompositores da serapilheira produzem estruturas puramente orgânicas, são menos persistentes, mas regulam a atividade microbiana. Esse grupo inclui diferentes grupos de invertebrados, compreendendo micro e macro-artrópodos que se alimentam e vivem na serapilheira, cupins xilófagos, minhocas epigéicas, além de pequenas minhocas da família Enchytraeidae. Esses organismos são ativos fragmentadores que desenvolvem interação com a microflora tipo “rúmen externo”, bem como atuam “pastejando” a biomassa de fungos (GILLER et al., 1997).

Os micropredadores, principalmente protozoários e nematoides, se alimentam dos micro-organismos. Esse grupo vive em filme de água e não desenvolve relações mutualísticas com a microflora. A atividade desses invertebrados tem importante papel na regulação da biomassa de micro-organismos, mantendo a diversidade por meio da prevenção da dominância de grupos específicos (AQUINO & ASSIS, 2005).

A predação seletiva de fungos e bactérias, feita especialmente pela microfauna; a estimulação, digestão e disseminação de microrganismos ingeridos pela microfauna e a fragmentação dos detritos realizada pelas meso e macrofauna interferem na decomposição da matéria orgânica e alteram a disponibilidade de nutrientes para as plantas (CRAGG & BARDGETT, 2001). Assim, é fácil verificar que os organismos do solo estão interligados em uma cadeia alimentar e que ao impactar um componente desta cadeia, afeta indiretamente todo o restante. A fauna exerce um papel de regulação das populações microbianas.

O metabolismo microbiano e a atividade das enzimas no solo são estimulados pelos nutrientes provenientes, principalmente da excreção dos animais via fezes e urina que são incorporados ao solo. Os numerosos processos bioquímicos que ocorrem no solo, devido à atividade microbiana têm efeitos sobre

as propriedades físicas e químicas, proporcionando reflexos sobre o desenvolvimento de plantas, conseqüentemente melhorando a qualidade do ambiente (STEFFEN et al., 2007).

1.1.1.2 Excreção e a importância da fauna edáfica

Nos ecossistemas de pastagem, a produção de forragens depende da reciclagem da matéria orgânica produzida e da quantidade de elementos minerais disponível. De fato, a contribuição dos animais, principalmente herbívoros que usufruem deste ambiente por um período maior de tempo, na adição de matéria orgânica pelos bolos fecais é considerável. Cerca de 70 a 95% dos nutrientes ingeridos podem retornar à pastagem pelas excreções (RUSSELLE, 2007). Um bovino adulto defeca 11 a 16 vezes por dia. Em cada evento produz 1,5 a 2,7 kg de fezes (MATHEWS & SOLLENBERGER, 1996), enquanto que para um ovino adulto a excreção de fezes diária em peso seco é de 350 g (WHITEHEAD, 1970).

Entre os macronutrientes, o fósforo, o cálcio e o magnésio são excretados principalmente nas fezes; o nitrogênio e o enxofre podem ser excretados em significantes proporções tanto nas fezes como na urina; e o potássio é excretado em maior quantidade na urina (HAYNES & WILLIAMS, 1993). O retorno diário de nutrientes pelas fezes, por animal, foi estimado em 22,10 g de nitrogênio, 10,06 g de fósforo, 6,12 g de potássio, 21,70 g de cálcio e 9,47 g de magnésio para novilhas com peso médio inicial de 300 kg em pastagem de *Brachiaria decumbens* na Zona da Mata de Minas Gerais (BRAZ et al., 2002).

Dentro deste contexto, o papel dos invertebrados coprófagos (especialmente coleópteros e insetos) é fundamental para a decomposição das fezes, por meio do enterramento, enriquecendo os horizontes edáficos subjacentes (KALISZ & STONE, 1984). Em efeito, os microartrópodes aproveitam as galerias abertas pelos insetos coprófagos para colonizar e transformar os excrementos em um ambiente epígeo. Adicionalmente, estes transportam passivamente os conídios aderidos em seus tegumentos para o interior dos bolos fecais (GARCIA et al., 2004).

Além destes fatores bióticos, os abióticos como tamanho e forma das fezes, composição, umidade, pH, e localização, bem como condições meteorológicas prevalentes e as perturbações mecânicas, influenciam nos processos de incorporação das fezes no solo (BARTH, 1993).

1.1.2 Estrutura química e modo de ação da moxidectina

A moxidectina é uma milbemicina, sendo a mais utilizada para animais de produção para o tratamento de endoparasitos. É obtida sinteticamente a partir da nemadectina. Sua estrutura química é pertencente ao grupo das lactonas macrocíclicas, cuja fórmula estrutural é $C_{37}H_{53}NO_8$. É produzida naturalmente pela fermentação da bactéria *Streptomyces cyanogriseus subsp. Noncyanogenus* (REINEMEYER & COURTNEY, 2001), e apresenta uma substituição do grupamento hidroxila no C-23 por um grupamento metiloxima (PRICHARD et al., 2012). Apresenta uma estrutura cíclica principal composta por dezesseis elementos, incluindo o grupamento éster, conferindo a classificação de lactona. Também possui um espiroacetal e um anel benzofurânico como estrutura.

As lactonas macrocíclicas possuem massas moleculares ($639,4 \text{ g.mol}^{-1}$) e valores de coeficiente de partição ($6,0 \text{ Log } K_{o/w}$) elevados, caracterizando-se como substância lipofílica. Segundo ONG et al. (1996), a velocidade de absorção de substâncias lipofílicas por um organismo é diretamente proporcional ao coeficiente de partição. Estudos têm demonstrado que a moxidectina é a molécula mais lipofílica dentre as lactonas macrocíclicas. Esta diferença permite seu armazenamento no tecido adiposo, proporcionando efeito acumulativo e uma prolongada permanência deste fármaco no corpo do animal (PRICHARD et al., 2012). Desta forma, sua solubilidade em água é de $0,51 \text{ mg.L}^{-1}$, e em solventes orgânicos como, diclorometano, éter etílico, etanol (95%), acetonitrila e acetato de etila, a solubilidade em mL de solvente g^{-1} de moxidectina é de 1,64; 1,19; 0,81; 0,62 e 0,47, respectivamente.

Possuem ação contra nematoides e artrópodes por meio da afinidade das lactonas macrocíclicas aos neurotransmissores glutamato dos seres invertebrados e

ácido γ -aminobutírico (GABA) de alguns invertebrados e vertebrados (PRICHARD et al., 2003). A união da moxidectina aos receptores GABA pós-sinápticos permite atuar de forma inibitória produzindo a hiperpolarização das células musculares devido ao incremento na permeabilidade ao íon cloro, induzindo à paralisia flácida ao parasito (PÉREZ, 2004). O bloqueio do GABA repercute na sinapse entre os nervos ventral e motores, produzindo incoordenação e expulsão dos parasitos do hospedeiro (PÉREZ, 2004). Outra ação da moxidectina é ativar os canais de cloro ativados pelo glutamato, induzindo a paralisia da musculatura faringiana, provocando a morte do parasito por inanição (ARDELLI et al., 2009).

1.1.3 Impacto ambiental do resíduo de lactonas macrocíclicas excretado nas fezes

1.1.3.1 Persistência no ambiente

As avermectinas são metabolizadas em baixas proporções no fígado, excretadas pela bile e eliminadas pelas fezes, sendo a principal via de excreção (KROGH et al., 2008). A eliminação é prolongada, apresentando um aporte contínuo do fármaco ativo, tendo como consequência a maior permanência no ambiente (PÉREZ et al., 2001). A formulação, a dosagem e a via de administração podem ser os fatores mais importantes para a persistência e ecotoxicidade dos fármacos (HERD, 1995), proporcionando diferenças em relação ao tempo e ao nível de excreção via fezes (SUÁREZ et al., 2009). Além disso, estas substâncias se ligam fortemente às fezes, apesar da taxa de degradação estar fortemente influenciada pelas condições edafoclimáticas (ERZEN et al., 2005). Foi avaliada a degradação de abamectina e doramectina no solo e nas fezes de ovinos em condições ambientais, permanecendo 30 cordeiros em uma área de pastagem de 600 m² por seis dias pós-tratamento com doramectina ou abamectina. As mensurações de persistência destes vermífugos foram realizadas do dia seis ao dia 70 pós-tratamento, sendo encontradas quantidades elevadas de resíduos de abamectina nas fezes, verificando-se médias de 800 \pm 46 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de MS de fezes no dia 6 pós-tratamento, e

pós 70 dias de tratamento, persistiam-se concentrações médias de $213 \pm 10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de MS de fezes. Entretanto, ao considerar apenas o solo, a concentração foi muito baixa, permanecendo próxima à zero, cuja média foi de $0,69 \pm 0,13 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de MS de solo (ERZEN et al., 2005).

Com o resíduo de doramectina, nessa mesma pesquisa, verificaram queda brusca de resíduo no solo e nas fezes até o dia 50 pós-tratamento, de $33,1 \pm 4,4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de MS para $0,30 \pm 0,08 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de MS e $1235 \pm 707 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de MS para $146 \pm 23 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de MS, nos dias 6 e dia 50 pós-tratamento para solo e fezes, respectivamente.

Estudos sobre a excreção de resíduo de avermectina nas fezes de ovinos demonstraram que o máximo de excreção foi observado no dia três pós-tratamento para abamectina ($1270 \pm 74 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de MS de fezes) e entre o dia dois pós-tratamento para doramectina ($2186 \pm 145 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de MS de fezes). Para ambas as avermectinas, a concentração excretada nas fezes decresceu rapidamente até os nove dias pós-tratamento (KUZNER et al., 2003). A ivermectina, também apresentou pico de excreção via fezes aos quatro dias pós-tratamento ($0,81 \text{ mg.kg}^{-1}$ peso seco) e decresceu rapidamente após sete dias pós-tratamento ($0,31 \text{ mg.kg}^{-1}$) (RÖMBKE et al., 2010).

A moxidectina, semelhante às outras lactonas macrocíclicas, apresenta pico de eliminação nos três primeiros dias pós-tratamento (IWASA et al. 2008; SUÁREZ et al. 2009).

1.1.3.2 Impacto sobre a fauna coprófaga

As lactonas macrocíclicas, como as avermectinas e milbemicinas, são potentes anti-helmínticos, exercendo atividade contra endo e ectoparasitas (FLOATE et al., 2005). As altas concentrações destes fármacos excretadas nas fezes, principalmente nas primeiras semanas pós-tratamento, podem afetar as populações de fauna coprófaga que mantiverem contato com estas fezes. Entretanto, FLOATE et al. (2001) relatam que há espécies que são susceptíveis, mesmo em concentrações baixas de anti-helmíntico.

A moxidectina tem sido apresentada como mais inofensiva sobre os insetos especialmente besouros coprófagos que utilizam estas fezes (FLOATE et al., 2001). Entretanto, alguns estudos demonstraram que a moxidectina afeta a fauna coprófaga. DOHERTY et al. (1994) verificaram a ação larvicida da moxidectina in-vitro contra *Onthophagus gazella* (coleóptero) e *Haematobia irritans exigua* (díptero) em concentrações crescentes deste resíduo nas fezes (4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 e 512 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). A sobrevivência das larvas de *Haematobia irritans exigua* foi afetada a partir da concentração de 128 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, entretanto a moxidectina não prejudicou a eclosão de indivíduos adultos desta espécie. Ao considerar a espécie de coleóptero estudada, nesse trabalho, não houve efeito na ovoposição, e a sobrevivência larval foi menor na concentração de 512 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Em condições ambientais o efeito do resíduo de anti-helmíntico sobre a fauna coprófaga, também foi verificado. Alguns trabalhos realizaram a comparação entre estes fármacos, com o intuito de identificar o produto com menor toxicidade. SUÁREZ et al. (2009), avaliaram o efeito do resíduo de moxidectina, cuja via de administração foi sub-cutânea e “pour-on”, e doramectina sub-cutânea, sobre a atividade de artrópodes nas fezes de bovinos, expostas ao ambiente. Nesse trabalho, as coletas de fezes foram realizadas nos dias 3, 11 e 21 pós-tratamento e, a contagem dos indivíduos foi realizada nos dias 6, 14, 21 e 42 pós-exposição ao ambiente. Tanto o resíduo de moxidectina como de doramectina reduziram a população de dípteros nas fezes em relação ao controle. Para o resíduo de moxidectina, o efeito sobre a população de dípteros foi verificado em fezes coletadas de animais de três pós-tratamento expostas ao ambiente até 21 dias e 11 dias pós-tratamento, expostas ao ambiente até 42 dias. Entretanto, para o resíduo de doramectina a excreção de resíduo nas fezes é prejudicial à população de dípteros até 21 dias pós-tratamento, com ação tóxica até 21 dias de exposição ao ambiente.

Para a população larval de coleópteros, SUÁREZ et al. (2009) verificaram que a ação do resíduo de anti-helmíntico foi menor, verificando efeito no dia 3 pós-tratamento e após 21 dias de exposição ao ambiente. Em relação à comparação de moxidectina e doramectina, esta se tornou mais nociva às larvas. Nesse estudo, os resíduos de anti-helmínticos nas fezes não prejudicaram a atração dos coleópteros adultos pelos bolos fecais, ao contrário dos resultados obtidos por SUÁREZ (2002). Ao utilizar a metodologia de captura do tipo armadilha de queda (*pitfall*) com fezes

tratadas e não tratadas com anti-helmínticos, FLOATE (2006) afirma que a presença destes fármacos afeta a atração de insetos adultos, com menor efeito para moxidectina em comparação a doramectina. Esta menor toxicidade da moxidectina contra a fauna coprófaga quando comparada à doramectina e as outras avermectinas, também foi verificada em outros insetos, tal como, o mosquito *Anopheles* (BUTTERS et al., 2012). Este fato pode estar associado a menor afinidade do íon da moxidectina ligado aos receptores GABA pós-sinápticos destes insetos em comparação à avermectinas (PRICHARD, et al., 2012). ARDELLI et al. (2009) mostraram que a ivermectina paralisava a musculatura faringiana com uma potência 64 vezes maior que a moxidectina.

Além da diferença de resultados entre as lactonas macrocíclicas (avermectina e milbemicinas) a forma de administração proporcionou efeitos diferentes sobre a fauna coprófaga. Estes estão relacionados com o comportamento e concentrações distintas de excreção nas fezes destes resíduos entre a via subcutânea e via “pour-on”. A via de administração “pour on” apresenta maior efeito contra as larvas presentes nos bolos fecais nos primeiros 3 dias pós-tratamento e menos prejudicial após este período, em relação ao tratamento subcutâneo. O comportamento dos animais em lambar a região onde foi administrado o anti-helmíntico “pour-on” foi justificativa pelas maiores excreções de resíduo nas fezes nos primeiros dias pós-tratamento (SALLOVITZ et al., 2003).

REFERÊNCIAS

AFZAL, J.; BURKE, A.; P. BATTEN; DELAY, R.; MILLER, P. Moxidectin: metabolic fate and blood pharmacokinetics of 14c-labeled moxidectin in horses. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 45 p. 3627-3633, 1997.

ALVINERIE, M.; ESCUDERO, E.; SUTRA, J.F.; EECKHOUTTE, C.; GALTIER, P. The pharmacokinetics of moxidectin after oral and subcutaneous administration to sheep. **Veterinary Research**. v. 29, p.113-118, 1998.

AMARANTE, A.F.T.; SALES, R. de O. Controle de endoparasitoses dos ovinos: uma revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. v. 1, p.14-36, 2007.

ANDERSON, J.M. Invertebrate-mediated transport process in soils. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 25, p. 5-14, 1988.

AQUINO, A.M. de; ASSIS, R.L. de. (Ed.). Fauna do Solo e sua Inserção na Regulação Funcional do Agroecossistema. In: AQUINO, A.M. de. **Processos Biológicos no Sistema Solo-Planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável**. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, DF, 2005. p. 47-75.

ARDELLI, B.F.; STITT, L.E.; TOMPKINS, J.B.; PRICHARD, R.K. A comparison of the effects of ivermectin and moxidectin on the nematode *Caenorhabditis elegans*, **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 96-108, 2009.

ARENA, J.; LIU, K. K., PARESS, P. S.; CULLY, D. F. Avermectin-sensitive chloride currents induced by *Caenorhabditis elegans* RNA in *Xenopus* oocytes. **Molecular Pharmacology**, v.40, p. 368-374, 1991.

BARGER, I. 2001. El manejo de la resistencia a las lactonas macrocíclicas en los nemátodos parásitos de los ovinos. Simposio de Moxidectina. The 18th international conference of the world association for the advancement of veterinary parasitology 26-30 Agosto, Stresa Italia.

BARROW, N.J. Return of nutrients by animals. In: SNAYDON, R.W. (Ed.) **Ecosystems of the world 17B – Managed Grasslands/Analytical Studies**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p.181-186.

BARTH, D. Importance of methodology in the interpretation of factors affecting degradation of dung. **Veterinary Parasitology**, v. 48, p. 99-108, 1993.

BRAZ, S.P.; NASCIMENTO JR., D.; CANTARUTTI, R.B.; REGAZZI, A.J.; MARTINS, C.E. FONSECA, D.M. da. Aspectos quantitativos do processo de reciclagem de nutrientes pelas fezes de bovinos sob pastejo em pastagem de *Brachiaria decumbens* na zona da Mata de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.858-865, 2002.

BREYMEYER A. Analysis of a sheep pasture ecosystem in the pieniny mountains (the Carpathians). XI. The role of coprophagous beetles (Coleoptera, Scarabaeidae) in the utilization of sheep dung. **Ekologia Polska.**, v. 22, n. 3-4, p. 617-634, 1974.

BROWN, G.G. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? **Plant and Soil**, v.170, p. 209-231, 1995.

BUTTERS, M.P.; KOBYLINSKI, K.C.; DEUS, K.M.; DA SILVA, I.M.; GRAY, M.; SYLLA, M.; FOY, B.D. Comparative evaluation of systemic drugs for their effects against *Anopheles gambiae*. **Acta Tropica**, v. 121, p. 34-43, 2012.

COSTA, A.J. et al. Avaliação comparativa da ação anti-helmíntica e do desenvolvimento ponderal de bezerros tratados com diferentes avermectinas de longa ação. **A Hora Veterinária**, v.24, n.139, p.31-34, 2004.

CRAGG, R.G.; BARDGETT, R. How changes in soil faunal diversity and composition within a trophic group influence decomposition processes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 2073-2081, 2001.

DECÄENS, T.; LAVELLE, P.; JIMÉNEZ, J.J.; ESCOBAR, G.; RIPPSTEIN, G.; SCHNEIDMADL, J.; SANZ, J.I.; HOYOS, P.; THOMAS, R.J. Impacto del uso de la tierra en la macrofauna del suelo de los Llanos Orientales de Colombia. In: JIMÉNEZ, J.J.; THOMAS, R.J. (Ed.). **El arado natural**: las comunidades de macroinvertebrados del suelo en las savanas neotropicales de Colombia. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 2003. p.21-45. (Publicación CIAT, 336).

DOHERTY, W.M., STEWART,N.P., COBB, R.M., KEIRAN,P.J. In vitro comparison of the larvicidal activity of moxidectin and abamectin against *Onthophagus gazella* (F.) (Coleoptera: Scarabaeidae) and *Haematobia irritans exigua* De Meijere (Diptera: Muscidae). **Journal Australian of Entomology**. Society, v. 33, p. 71–74, 1994.

ERZEN, N.K; KOLAR, L.; FLAJS, V.C.; KUZNER, J.; MARC, I.; POGACNIK, M. Degradation of abamectin and doramectin on sheep grazed pasture. **Ecotoxicity** v. 14, p. 627–635, 2005.

FLOATE, K.D. Endectocide use in cattle and fecal residues: environmental effects in Canada residues affect insect attraction to dung from treated cattle: implications for toxicity tests. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 70, p. 1-10, 2006.

FLOATE, K.D.; WARDHAUGH, K.G.; BOXALL, A.B.A.; SHERRATT, T.N. Fecal Residues of Veterinary Parasiticides: Nontarget effects in the pasture environment. **Annual Reviews Entomology**, v. 50, p. 153- 179, 2005.

FLOATE, K.D.; SPOONER, R., COLWELLI, D. Larvicidal activity of endectocides against pest flies in the dung of treated cattle. **Medicine Veterinary. Entomology**. 15, 117–120, 2001.

GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABÓ, M.P.J. Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1513-1518, 2004.

GIRACCA, E.M.N.; ANTONIOLLI, Z.I.; ELTZ, F.L.F.; BENEDETTI, E.; LASTA, E.; VENTURINI, S.F.; VENTURINI, E.F.; BENEDETTI, T. Levantamento da meso e macrofauna do solo na microbacia do Arroio Lino, Agudo/RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, p. 257-261, 2003.

GILLER, K.L.; BEARE, M.H.; LAVELLE, P.; IZAC, A.M.N.; SWIFT, M.J. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v. 6., p. 3-16, 1997.

HAYNES, R.J.; WILLIAMS, P.H. Nutrient cycling and fertility in the grazed pasture ecosystem. **Advances in Agronomy**, v.49, p.119-199, 1993.

HEISLER, C.; KAISER, E.A. Influence of agricultural traffic and crop management on Collembola and microbial biomass in arable soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.19, n. 2/3, p. 159-165, 1995.

HERD, R. Endectocidal drugs: Ecological risks and counter-measures. **International Journal of Parasitology**, v. 25, n. 8, p. 875–885, 1995.

HOPKIN, S.P.; READ, H.J. **The Biology of Millipedes**. New York: Oxford University Press, 233p, 1992.

IWASA, M.; SUZUKI, N.; MARUYAMA, M. Effects of moxidectin on coprophagous insects in cattle dung pats in Japan. **Applied Entomology and Zoology**, v. 43, p. 271-280, 2008.

KALISZ, P.J.; STONE, E.L. Soil mixing by scarab beetles and pocket gophers in North Central Florida. **Soil Science Society of America Journal**. v. 48, p. 169-172, 1984.

KUZNER, J.; KOZUH ERZEN, N.; KOLAR, L.; KOBAL, S.; MARC, I.; CERKVENIK FLAJS, V.; POGACNIK, M. Time profile of excretion and behaviour of abamectin in soil from a grazed pasture of treated animals. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. Suppl. 26 (suppl. 1), 257, 2003.

KROGH, K.A.; BJÖRKLUND, E.; LOEFFLER, D.; FINK, G.; HALLING-SORENSEN, B.; TERNES, T.A. Development of an analytical method to determine avermectins in water, sediments and soil using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1211, p. 60-69, 2008.

LAVELLE, P.; SPAIN, A.V. **Soil ecology**. Dordrecht: Kluwer Academic Pub., 2001. 654p.

MACFADYEN, A. Relations between mites and microorganisms and their significances in soil biology. 1st Internacional congress of acarology proceedings, **Acarologia** VI, p.147-149, 1964.

MARTÍNEZ, I.M.; LUMARET, J.P. Las prácticas agropecuárias y sus consecuencias en la entomofauna y el entorno ambiental. **Folia Entomologica Mexicana**, v. 45, p. 57-68, 2006.

MATHEWS, B.W.; SOLLENBERGER, L.E. **Grazing systems and spatial distribution of nutrients in pastures: soil considerations**. In: NUTRIENT CYCLING IN FORAGE SYSTEMS. 1996, Columbia, Proceedings... JOOST, R. E. and ROBERTS, C. A. (eds.). Columbia: University of Missouri, 1996. p. 213-229.

MELO, A.C.F.L. Caracterização do nematóide de ovinos, *Haemonchus contortus*, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis, no estado do Ceará, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 104p, 2005.

MOLENTO, M.F. Método Famacha tratamento seletivo no controle do *Haemonchus contortus*. In: **Simpósio sobre Controle de Parasitas em Pequenos Ruminantes**. FEINCO/SP, 2005.

MOORE, J.C.; WALTER, D.E. Arthropod regulation of micro-and mesobiota in below-ground detrital food webs. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 33, p. 419-439, 1988.

MULROY, A. Monitoring and Analysis of Water and Wastes. **Water Environment Technology**, v. 13, n. 2, p. 32-36, 2001.

ONG, S.; LUI, H.; PIDGEON, C. Immobilized-artificial-membrane chromatography measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability. **Journal of Chromatography A**, v. 728, p.113-128, 1996.

PAIVA, F. et al. Resistência a ivermectina constatada em *Haemonchus placei* e *Cooperia punctata* em bovinos. **A Hora Veterinária**, v.20, n.120, p.29-32, 2001.

PÉREZ, R.; CABEZAS, I. SUTRA, J.F., GALTIER, P.; ALVINERIE, M. Fecal excretion profile of moxidectin and ivermectin after oral administration in horses. **The Veterinary Journal**, v. 161, p. 85-92, 2001.

PÉREZ, R.; CABEZAS, I.; GODOY, C.; RUBILAR, L.; DÍAZ, L.; MUÑOZ, L.; ARBOIX, M.; ALVINERIE, M. Disposición plasmática y fecal de moxidectina administrada por vía oral en caballos. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 33, n. 1, p. 77-88, 2004.

PRICHARD, R.; FORRESTER, S.; NJUE, A.; FENG, X.; LIU, J.; BEECH, R. Receptor mechanisms of antiparasitics. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 29-31, 2003.

PRICHARD, R.; MÉNEZ, C.; LESPINE, A. Moxidectin and the avermectins: consanguinity but not identity. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 134-153, 2012.

PRICHARD, R.K. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v.54, p.259-268, 1994.

RANGEL V.B.; LEITE, R.C.; OLIVEIRA, P.R.; SANTOS, E.J. Resistência de *Cooperia spp.* e *Haemonchus spp.* às avermectinas em bovinos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.2, p.186-190. 2005.

REINEMEYER, C.; COURTNEY, C.H. **Antinematodal drugs**. In: H. R. Adams (Ed.). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Iowa State University Press. Iowa, USA, p. 947-979, 2001.

RÖMBKE, J.; COORS, A.; FERNÁNDEZ, A.A.; FÖRSTER, B.; FERNANDÉZ, C.; JENSEN, J.; LUMARET, J.P.; COTS, M.A.P.; LIEBIG, M. Effects of the parasiticide ivermectin on the structure and function of dung and soil invertebrate communities in the field (Madrid, Spain). **Applied Soil Ecology**, v. 45, p. 284-292., 2010.

RUSSELLE, M.P.; ENTZ, M.H.; FRANZLUEBBERS, A.J. Reconsidering integrated crop-livestock systems in North America. **Agronomy Journal**, Madison, v.99, p.325-334, 2007.

SALLOVITZ, J.M.; LIFSCHITZ, A.; IMPERIALE, F.; VIRKEL, G.; LANUSSE, C.E. A detailed assessment of the pattern of moxidectin tissue distribution after pour-on treatment in calves. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 397–404, 2003.

SANTIAGO, M. A. M.; BENEVENGA, S. F.; COSTA, U. C. Epidemiologia e controle da helmintose ovina no município de Itaqui, Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 1-7, 1976.

SONG B.; YIN X.; ZHANG, Y. et al. Dynamics and relationship of Ca, Mg, Fe in litter, soil fauna and soil in Pinus koraiensis-broadleaf mixed forest. **Chinese Geographical Science**, v. 18, p. 284–290, 2008.

STEFFEN, R. S.; ANTONIOLLI, Z. I.; KIST, G. P. Avaliação de substratos para reprodução de colêmbolos nativos em condições de laboratório. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 3, p. 265-269, 2007.

SUÁREZ, V.H. Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. **Veterinary Research**. v. 33, p. 563–573, 2002.

SUÁREZ, V.H.; LIFSCHITZ, A.L.; SALLOVITZ, J.M.; LANUSSE, C.E. Effects of faecal residues of moxidectin and doramectin on the activity of arthropods in cattle dung, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n.5, p. 1551-1558, 2009.

SWIFT, M.J.; HEAL, O.W.; ANDERSON, J.M. *Decomposition in terrestrial ecosystems*. Oxford: Blackwell, 1979. 372p.

USDA. **United States Department of Agriculture**. Disponível em: <www.usdabrazil.org.br>. Acesso em: 01 mai. 2013.

WHITEHEAD, D.C. The role of nitrogen in grassland productivity. **Bulletin 48 Common Wealth Bureau of Pastures and field Crops**, Berkshire, England, 1970.

WILKINSON, S.R.; LOWERY, R.W. Cycling of mineral nutrients in pasture ecosystems. In: BUTTLER, G. W. and BALLEY, R. W. (eds.). **Chemistry and Biochemistry of herbage**, Vol. 2. New York: Academic Press, 1973. p. 247-315.

YIN, X.; LI, J.; DONG, W. Microelement contents of litter, soil fauna and soil in *Pinus koraiensis* and broad-leaved mixed forest. **Chinese Journal of Applied Ecology**, v. 18, p. 277–282, 2007a.

YIN, X., QIU, L., YANG, L. et al. The relation and difference of nutritional elements in forest litter-macrofauna-soil system. **Geographical Research**, v. 25, p. 320–326, 2006.

YIN, X.; SONG, B.; QIU, L. Dynamic characteristics of N, P, K in the litter-soil fauna-soil system of mixed *Pinus koraiensis* and broad-leaved forest. **Acta Ecologica Sinica**, v. 27, p. 128–134, 2007b.

2. TAXA DE EXCREÇÃO VIA FEZES E PERSISTÊNCIA AMBIENTAL DA MOXIDECTINA APLICADA EM OVINOS

RESUMO

O objetivo deste estudo compreende a avaliação da cinética de excreção de moxidectina (MOX) por meio das fezes de cordeiros após a sua aplicação subcutânea, assim como a avaliação da persistência no ambiente do resíduo deste anti-helmíntico, eliminado nas fezes. Para tanto, foi desenvolvido e validado um método analítico para determinação da MOX nas fezes, utilizando cromatografia líquida de ultra-alta pressão com detecção por espectrometria de massas (UPLC-MS/MS). Sete cordeiros da raça Suffolk, em delineamento inteiramente casualizado, com peso corporal de $36,06 \pm 3,23$ kg e 113 ± 1 dias de idade receberam, por via subcutânea, uma única dose de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso corpóreo. As coletas de fezes foram realizadas após 6, 12, 18, 24, 30 e 36 horas e 2, 3, 5, 9, 14, 21, 28, 35 e 42 dias da aplicação da MOX. Adicionalmente, para avaliar a persistência do resíduo de MOX no ambiente, foram selecionados treze carneiros das raças Suffolk e Dorper, em delineamento blocos casualizados, com $76,43 \pm 34,24$ kg e separados em dois grupos, controle e tratados com moxidectina, cujas fezes, de ambos os tratamentos, foram coletadas no tempo máximo de excreção após aplicação (tratados com moxidectina) de uma única dose de MOX (Cydectin®) via subcutânea de $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ de peso corporal, por meio de bolsas, e expostas ao ambiente, com e sem cobertura à chuva, até aos 88 dias. O método analítico desenvolvido foi validado apresentando exatidão entre 80-120% e valores de precisão intra e interdias entre 6,24-9,44%. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) determinados foram de $3,08 \text{ ng.g}^{-1}$ e $5,14 \text{ ng.g}^{-1}$, respectivamente. Os resultados dos parâmetros de validação demonstraram que o método foi adequado para determinar a presença da MOX nas fezes. A excreção de MOX nas fezes apresentou valor de $C_{\text{máx}}$ de $22,74 \text{ ng.g}^{-1}$, no $T_{\text{máx}}$ de 39,92 horas. O valor da AUC foi de $13292 \text{ ng.g}^{-1}.\text{h}$. A concentração de MOX verificada nas fezes dos carneiros ($35,94 \pm 2,96$ e $38,50 \pm 4,71 \text{ ng.g}^{-1}$, para os tratamentos com ou sem cobertura, respectivamente) foi semelhante a concentração verificada no estudo de excreção. O isolamento, ou não, do bolo fecal contra a chuva não interferiu na degradabilidade ou percolação da MOX, pois a concentração aos 88 dias foi de $28,07 \pm 5,90$ e $29,22 \pm 5,31$, apresentando uma degradabilidade de 17,61% e 27,14%, respectivamente para os tratamentos com ou sem cobertura. Verificou-se que a molécula de MOX apresentou elevada sorção nas fezes.

Palavras-chave: ambiente, aplicação subcutânea, cromatografia líquida, degradabilidade, resíduo

RATE OF EXCRETION IN FEACES AND ENVIRONMENTAL PERSISTENCE OF MOXIDECTIN APPLIED IN SHEEP

ABSTRACT

The objective was to assess the kinetic of excretion of moxidectin molecule in feaces of lamb after subcutaneous administration. To that end, we developed and validated an analytical method for determination of moxidectin in feaces by liquid chromatography ultra-high pressure and quantification by mass spectrometry (LC-MS/MS). Seven Suffolk lambs in a completely randomized design with 36.06 ± 3.23 kg body weight were dosed subcutaneously with 0.2 mg.kg^{-1} body weight in a single dose, The fecal samples were taken after 6, 12, 18, 24, 30 and 36 hours and 2, 3, 5, 9, 14, 21, 28, 35 and 42 days of application of MOX. Additionally, to assess the persistence of moxidectin residues in the environment, thirteen Suffolk and Dorper sheep in randomized complete block design with 76.43 ± 34.24 kg, separated into two groups: control and moxidectin treated, whose faeces from both treatments were collected in a maximum excretion after application (moxidectin treated) of a subcutaneous single dose of MOX (Cydectin®) 0.2 mg.kg^{-1} body weight, using bags and exposed to the environment, with and without rain cover, over 88 days. The analytical method was validated showing 80-120% accuracy and precision values of intra and inter - day between 6.24 -9.44%. The detection limits (LOD) and quantification (LOQ) were determined 3.08 ng.g^{-1} and 5.14 ng.g^{-1} , respectively. The results of the validation parameters showed that this method was suitable to determine the presence of MOX in lamb feaces. Moxidectin concentrations in the feaces showed $C_{\text{max}} 22,73 \text{ ng g}^{-1}$, in T_{max} of 39,92 hours. The value of AUC was $13292 \text{ ng g}^{-1}.\text{h}$. The observed concentration of 35.94 ± 2.96 and $38.50 \pm 4.71 \text{ ng.g}^{-1}$ for both treatments with or without coverage against rain, respectively, was similar to the concentration obtained in the study of excretion curve. Fecal isolation or not against the rain did not affect the degradability or molecule percolation, since the concentration over 88 days was 28.07 ± 5.90 and 29.22 ± 5.31 , with 17,61% and 27,14% degradability, respectively. The moxidectin molecule showed high adsorption in the feaces.

Key-words: Degradability, environment, liquid chromatography, residue, subcutaneous injection

2.1 INTRODUÇÃO

O Brasil, sendo o maior exportador mundial de carne (ABIEC, 2013), gasta 600 milhões de dólares em medicamentos veterinários, dos quais 44% são antiparasitários. Destacam-se, entre eles, as avermectinas (ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina) e a milbemicina moxidectina (SINDAN, 2013).

O principal impacto dos anti-helmínticos do grupo das avermectinas e milbemicinas sobre o ambiente resulta da sua excreção via fezes (Edwards et al., 2001), cuja eliminação situa-se entre 50 e 90% da dose aplicada (Mulroy, 2001), sendo deste percentual, 90% excretado nos primeiros 4 dias (Pérez et al., 2001). A contaminação dos produtos de origem animal e do ambiente pode ser prolongada, visto que estes fármacos são desenvolvidos para serem persistentes.

A moxidectina (MOX) é uma milbemicina, cuja estrutura química é pertencente ao grupo das lactonas macrocíclicas. As lactonas macrocíclicas possuem massas moleculares ($639,4 \text{ g mol}^{-1}$) e valores de coeficiente de partição óleo:água ($6,0 \text{ Log } K_{o/w}$) elevados, caracterizando-se como substância hidrofóbica, de baixa volatilidade e solubilidade em solventes polares, com forte afinidade por lipídeos, solo e matéria orgânica. A moxidectina presente nas fezes misturadas ao solo tende a se ligar fortemente à matéria orgânica, aumentando a persistência neste ambiente por vários meses, ou possivelmente por anos, principalmente em condições anaeróbicas (Floate et al., 2005).

As lactonas macrocíclicas, como as avermectinas e milbemicinas, são potentes anti-helmínticos, exercendo atividade contra endo e ectoparasitas (Shoop et al., 1995). As altas concentrações destes fármacos excretadas nas fezes, principalmente nos primeiros dias pós-tratamento, podem afetar as populações de fauna coprófaga. Além disso, Anziani et al. (2001) e Floate et al. (2001) relatam que há espécies que são susceptíveis, mesmo em concentrações baixas do anti-helmíntico.

Almeida & Ayres (2002) afirmam que preocupação resultante do uso dos produtos está na excreção via fezes sob a forma inalterada, podendo exercer efeitos adversos sobre populações de artrópodos e nematódeos que colonizam o bolo fecal. Floate et al. (2005) relataram a persistência de MOX e ivermectina em misturas de

fezes e solo após 60 e 56 dias, respectivamente, e afirmam haver enorme variabilidade entre substâncias nesse aspecto.

A importância de se estudar o perfil de excreção e persistência no ambiente da molécula de MOX está em estabelecer medidas que diminuam a contaminação ambiental. Ao conhecer o comportamento da curva de excreção, permite-se que estratégias de manejo sanitário e de dejetos sejam adotadas de forma que menores concentrações de MOX sejam expostas ao ambiente, e conseqüentemente afete a fauna coprófaga. Além disso, para conhecer o real impacto deste fármaco, presente na produção de ovinos, principalmente em cordeiros, faz-se necessário avaliar a cinética de excreção via fezes.

Diversos estudos têm sido publicados quanto a presença de avermectinas e milbemicinas em fezes de animais de diferentes espécies, tais como equinos (Perez et al., 2001; Gokbulut et al., 2001), bovinos (Herd et al., 1996; Alvinieri et al., 1999), ovinos (Kolar et al., 2006; Erzen et al., 2007) e cervos (renas) (Asbakk et al., 1999), sendo que a determinação da MOX em fezes foi relatada unicamente para cavalos. Os métodos utilizados pelos diversos autores na determinação dos antiparasitários fez uso da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a detector de fluorescência (FL). Em geral, esta técnica de detecção é seletiva e sensível, porém necessita de uma etapa de derivatização para tornar o analito fluorescente, o qual é uma desvantagem do método dado o tempo gasto na determinação a instabilidade do derivado fluorescente (Cerkvenik-Flajs et al., 2010)

Poucos trabalhos são relatados na literatura a respeito do uso de espectrometria de massas como técnica de detecção de avermectinas e milbemicinas em fezes (Rudik et al, 2002), apesar dessa técnica, em comparação à FL, precisar de procedimentos simples na etapa de preparo da amostra, possuir elevada especificidade e detectibilidade, permitir a confirmação da identidade dos analitos e a determinação de resíduos dessas substâncias a nível de traços (ng g^{-1}).

O objetivo deste trabalho foi avaliar, em cordeiros, a cinética de excreção da MOX por meio das fezes, após aplicação subcutânea, bem como avaliar a persistência no ambiente do resíduo deste anti-helmíntico eliminado pelas fezes de ovinos. Para tanto, foi desenvolvido e validado um método analítico para determinação da MOX nas fezes utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas (LC-MS/MS).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O Estudo de campo, com o objetivo de avaliar o perfil de excreção da MOX nas fezes de cordeiros, foi conduzido no Laboratório de Produção de Ovinos e Caprinos da Universidade Federal do Paraná, LAPOC-UFPR (Brasil), entre dezembro de 2011 a janeiro de 2012. Adicionalmente, em março a junho de 2012, neste mesmo laboratório, realizou-se outro experimento, com o objetivo de avaliar a persistência da MOX no ambiente, bem como o efeito deste fármaco na decomposição, em fezes de carneiros. Para tanto, primeiramente, foi desenvolvido e validado um método analítico para a determinação da MOX nas fezes utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) no Laboratório de Toxicologia de Alimentos, do Departamento de Ciências de Alimentos da FEA-UNICAMP.

2.2.1 Solventes e Reagentes

Todos os solventes utilizados para extração do fármaco nas fezes foram de grau HPLC e os reagentes de grau analítico. A acetonitrila (ACN) foi adquirida da Mallinckrodt (Mallinckrodt Backer, EUA). O acetato de amônio foi adquirido da Merck (Germany) e o ácido fórmico da Acros-Organics (EUA).

As membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) e politetrafluoretileno (PTFE) (Milipore, EUA), ambas com 0,22 µm de porosidade, foram usadas para filtrar o extrato da amostra, solventes aquosos e solventes orgânicos.

Os padrões analíticos de MOX e emamectina (EMA) (padrão interno) foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich, EUA), com grau de pureza 97,1 % e 99,7 %, respectivamente.

A moxidectina 1% aplicada por via subcutânea nos cordeiros, para o ensaio de avaliação da cinética de excreção, e nos carneiros, para a avaliar a persistência do resíduo no ambiente, foi proveniente do vermífugo Cydectin® NF, pertencente ao laboratório Fort Dodge Saúde Animal.

2.2.2 Preparo de soluções

A solução padrão estoque foi preparada em ACN na concentração de 1,00 mg.mL⁻¹, armazenada em frascos âmbar e mantida em freezer a temperatura de -20 °C.

As soluções de trabalho foram preparadas diariamente pela diluição apropriada da solução estoque em ACN, nas concentrações de 1.000 ng.mL⁻¹ para MOX e 400 ng.mL⁻¹ para EMA, e armazenadas sob refrigeração.

2.2.3 Amostras branco de fezes de cordeiro

As amostras branco, utilizadas para o estabelecimento das condições analíticas, foram analisadas e os cromatogramas inspecionados quanto à presença de interferentes que poderiam comprometer o desenvolvimento do método analítico. Nenhum interferente foi detectado nos tempos de retenção correspondentes a MOX e a EMA, garantindo a viabilidade das amostras branco.

2.2.4 Equipamentos

As análises cromatográficas foram realizadas em equipamento de cromatografia líquida Waters Acquity UPLC, acoplado ao espectrômetro de massas Waters Xevo TQ MS, equipado com fonte de *nanoeletrospray (UPLC- QqQ MS/MS)* (Milford, Massachusetts, USA).

Para a desgaseificação da fase móvel e na etapa de preparo das amostras foi empregado banho de ultrassom (Elma, modelo Transonic 460/H ultrasonic bath, Germany). No preparo das amostras foi utilizado agitador de tubos tipo vórtex (Quimis, Brasil) e para concentração dos extratos evaporador modelo HB4 Basic rotating evaporator (IKA, Germany). Para a separação das fases sólida e líquida da

amostra foi utilizada centrífuga (Thermo Scientific, modelo Heraeus Multifuge 3L-R centrifuge, USA).

2.2.5 Preparo de amostras

O desenvolvimento e validação do método analítico, assim como a análise das fezes foram realizadas no Laboratório de Toxicologia de Alimentos, do Departamento de Ciências de Alimentos da FEA-UNICAMP. Para o preparo das amostras, foram pesadas 2,00 g de fezes (controle branco) em tubos de polipropileno de 50 mL. Em seguida foram adicionados 10 mL de ACN, agitados em vórtex por 30 segundos e colocados em banho de ultrassom por 10 minutos. O tubo foi centrifugado a 10.000 x g, por 5 minutos, à 5 °C. O sobrenadante foi transferido para balão de fundo redondo de 50 mL e o precipitado extraído novamente, da mesma maneira como descrito acima. Juntaram-se os sobrenadantes os quais foram evaporados até à secura, utilizando rota-evaporador à 40°C. O resíduo foi resuspendido na fase móvel e filtrado em membranas de celulose com poros de 0,22 µm de diâmetro (Whatman, EUA), diretamente no vial, e injetados no *UPLC-MS/MS* QqQ. O esquema da marcha analítica está apresentado na Figura 1.

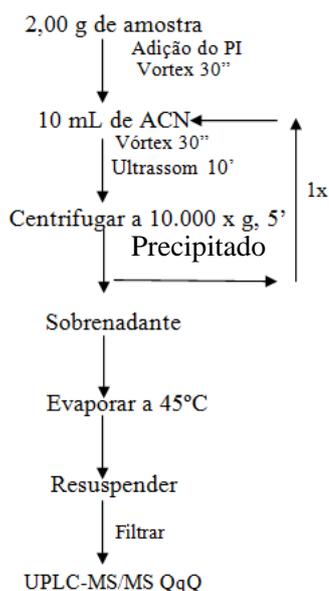


FIGURA 1 - Fluxograma do preparo da amostra para análise das fezes de cordeiro.

2.2.6 Condições do sistema UPLC-MS/MS QqQ

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna analítica de fase reversa C18 (50 x 2,1 mm, 2,7 μm) Poroshel 120 EC-18 (Agilente Technologies, USA), precedida por uma coluna guarda de fase similar (30 x 2,1 mm, 2,7 μm) à temperatura ambiente (25 °C). O volume de injeção empregado foi de 10 μL , a vazão da fase móvel (FM) foi de 0,5 mL min^{-1} e o tempo de corrida foi de 4 minutos.

Para o sistema UPLC-MS/MS QqQ (identificação e quantificação), foram estabelecidas as seguintes condições de ionização para a MOX e EMA: temperatura da fonte ajustada em 50 °C, voltagem do capilar de 3.00 KV, temperatura do gás de dessolvatação a 450 °C. O gás de colisão utilizado pelo detector foi argônio e o gás de nebulização utilizado pelo detector foi nitrogênio. O método de aquisição MS/MS foi o monitoramento de reação múltipla (MRM), realizado no modo positivo. Para a MOX, o íon precursor monitorado foi de 640.4 e seus fragmentos de transição (m/z) 528.3 e 498.3. Para a EMA, o íon precursor monitorado foi de 886.5 e seus fragmentos de transição (m/z) 158.0 e 302.2. Para quantificação da MOX e EMA foram utilizados os fragmentos de transição 528.4 e 158.0 (m/z) e para confirmação os fragmentos 498.3 e 302.2 (m/z), respectivamente.

A fase móvel foi constituída por tampão acetato de amônio 10 mM com adição de 0,1% de ácido fórmico (Fase A), e pela fase orgânica ACN (Fase B). A separação dos analitos foi por modo gradiente (Tabela 1).

TABELA 1 - Composição da fase móvel durante a corrida cromatográfica

TEMPO (min)	Fase A	Fase B
0 -2	50%	50%
2 – 2,5	5%	95%
2,51 – 4	50%	50%

2.2.7 Validação do método analítico

O método foi validado com base nas recomendações do Guia de Validação de Métodos Analíticos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011) e da Comunidade Europeia (EC, 2002), os quais estabelecem critérios de desempenho para os métodos analíticos destinados à determinação de resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal. Assim, os parâmetros avaliados foram: linearidade, seletividade, efeito matriz, precisão intra e interdia, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

A seletividade do método foi avaliada por comparação do cromatograma obtido da análise das amostras de fezes branco ($n = 10$) e das matrizes fortificadas, verificando-se a ausência de interferentes coeluinto com os analitos (MOX e EMA) ou próximo ao tempo de retenção.

A linearidade e a sensibilidade foram estabelecidas a partir das curvas analíticas em solução padrão, extrato fortificado e matriz fortificada em oito níveis de concentração (5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 100,0; 200,0; 300,0 e 400,0 ng.g^{-1}). Em todos os pontos do extrato e da matriz fortificada foi adicionado o padrão interno (EMA), na concentração constante de 40 ng.g^{-1} . Os resultados obtidos foram analisados pelo método de mínimos quadrados e a linearidade expressa como coeficiente de correlação linear (r).

Outro estudo importante para métodos analíticos empregando a técnica de LC-MS/MS é a avaliação do efeito matriz, destinado a verificar as interferências causadas por quaisquer elementos que compõem a matriz de amostragem, que poderiam gerar diminuição ou aumento de sinal. O efeito matriz foi avaliado pela realização dos testes F e t de Student e os efeitos obtidos para cada um dos analitos foram expressos em porcentagem. Para o cálculo, compararam-se os resultados obtidos para o extrato fortificado nos níveis de concentração correspondentes a 5,0; 100,0; 200,0 e 400,0 ng.g^{-1} , com os resultados obtidos para os mesmos níveis de concentração dos analitos dissolvidos em solvente.

A precisão do método foi determinada em duas situações: (i) repetibilidade (precisão intradia) e (ii) reprodutibilidade (precisão interdia). A precisão foi avaliada nos seguintes níveis de fortificação: 5,0; 100,0; 200,0; e 400,0 ng.g^{-1} , em 3 replicatas

para cada nível. A repetibilidade foi expressa pelo coeficiente de variação (CV %) dos resultados de cada nível de fortificação, analisados no mesmo dia. A reprodutibilidade também foi expressa pelo CV % dos resultados das análises realizadas em três dias diferentes (n = 3), pelo mesmo analista, usando o mesmo instrumento.

A exatidão foi avaliada através do teste de recuperação da matriz fortificada, em 4 níveis de fortificação 5,0; 100,0; 200,0; e 400,0 ng.g⁻¹. Cada nível de fortificação foi avaliado utilizando 3 replicatas. Os resultados foram expressos por meio da percentagem das concentrações médias fortificadas na matriz, em relação à concentração fortificada no extrato na mesma concentração.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram estabelecidos através da fortificação da matriz, no menor nível de concentração. O LOD foi expresso como a menor concentração cujo sinal equivale a 3 vezes a relação sinal/ruído, enquanto que o LOQ foi estabelecido como o menor nível capaz de produzir um sinal equivalente a 10 vezes a relação sinal/ruído, com precisão menor do que 20 % e exatidão de 80-120 %.

2.2.8 Ensaio com os animais

O ensaio com os cordeiros e carneiros foi conduzido nos meses de novembro de 2011 a janeiro de 2012, no Laboratório de Produção e Pesquisa em Ovinos e Caprinos (LAPOC), na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Paraná, localizada na região metropolitana de Curitiba, pertencente ao clima (Cfb). A realização do ensaio referente ao projeto “Resíduo de Moxidectina nos tecidos de cordeiros terminados em pasto submetidos a três programas de controle de endoparasitas e seu impacto ambiental” foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná (protocolo N° 055/2011).

2.2.9 Avaliação da cinética de excreção da MOX pelas fezes

Foi determinada a cinética de excreção nas fezes de cordeiros desmamados da MOX 1% aplicada por via subcutânea, por um período de até 42 dias após a aplicação. Para tanto, utilizaram-se sete cordeiros da raça Suffolk que nunca haviam recebido tratamento com anti-helmíntico. Do nascimento até o desmame, os cordeiros e as ovelhas foram mantidos em aprisco suspenso ripado. A partir da 1ª semana de vida, os cordeiros receberam dieta composta de concentrado farelado (20% de PB) e silagem de milho, por meio de suplementação em *creep feeding*. Os cordeiros foram vacinados contra as clostridioses e desmamados aos 74 ± 10 dias de idade e $27,0 \pm 2,1$ kg de peso corporal. Em seguida, foram confinados em baias individuais com piso ripado suspenso, cuja dieta era composta por 40 % de feno de azevém (volumoso) e 60 % de concentrado farelado (20% de PB), formulada para atender às exigências de cordeiros com potencial de crescimento rápido, com ganho médio diário de $0,253 \pm 0,043$ kg (NRC, 2007). A dieta foi fornecida *ad libitum*, duas vezes ao dia, com sobra diária de 10% para não limitar o consumo.

Aos 113 ± 1 dias de idade, após quarenta dias de adaptação às instalações, à água e à alimentação, os cordeiros receberam aplicação única subcutânea de MOX, na dose de 0,2 mg para cada kg de peso corporal. No dia da aplicação do anti-helmíntico, todos os animais foram pesados ($36,1 \pm 3,2$ kg) e a dose foi calculada individualmente com base no peso corporal do animal. A administração da dose foi feita com auxílio de seringa plástica graduada em escala de 0,1 mL, sendo aplicada na face interna da coxa direita para padronização do local de aplicação. A dose de MOX administrada foi calculada considerando-se que a sua concentração no medicamento veterinário utilizado é de 1%.

Para o desenvolvimento e validação do método analítico a matriz branco, sem a presença de anti-helmíntico, utilizou-se um cordeiro nascido na mesma época e com peso semelhante aos animais expostos, e que não tinha sido desverminado.

Em todos os animais, as coletas de fezes foram realizadas via ampola retal, após 6, 12, 18, 24, 30 e 36 horas e 2, 3, 5, 9, 14, 21, 28, 35 e 42 dias da aplicação da MOX.

Nos dias 1, 7, 14, 28 e 42 após a aplicação da MOX foi realizada a coleta total de fezes durante 24 horas, por meio de bolsas coletoras, para determinação da produção fecal diária. As fezes coletadas foram acondicionadas em sacos de papel, identificadas e secas em estufa a 60 °C, para determinação da matéria seca (MS).

2.2.10 Persistência da moxidectina nas fezes expostas ao ambiente

O estudo de campo foi conduzido no Laboratório de Produção e Pesquisa em Ovinos e Caprinos da Universidade Federal do Paraná, LAPOC-UFPR (Brasil), entre março e junho de 2012. As condições climáticas podem ser caracterizadas típicas para outono e inverno do sul do Brasil (Cfb) (Figura 2 e 3).

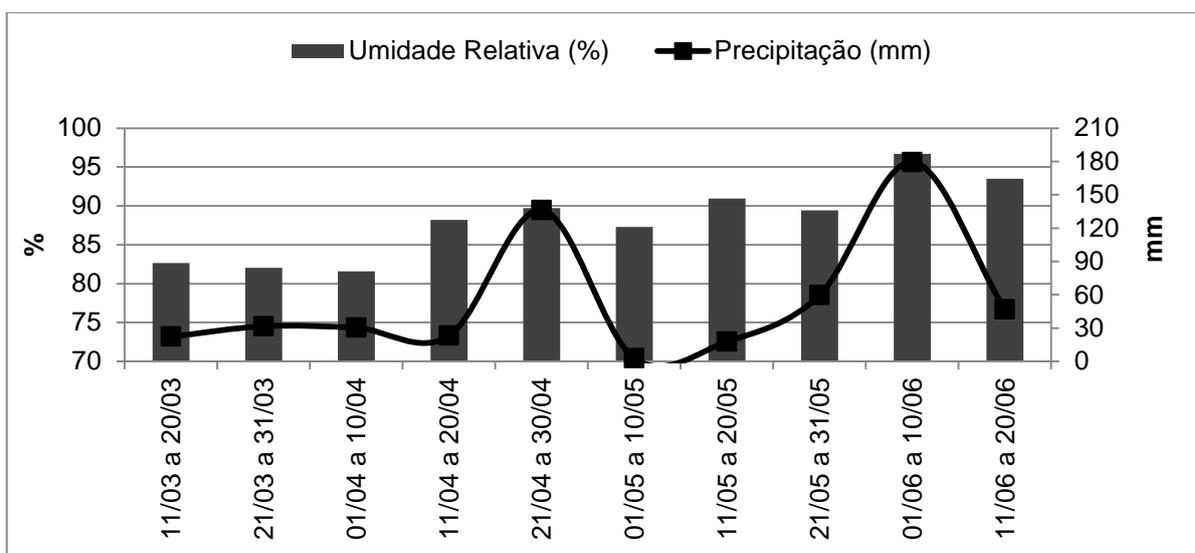


FIGURA 2 – Condições meteorológicas durante o período experimental, 19 de março a 18 de junho de 2012, PR, Brasil.

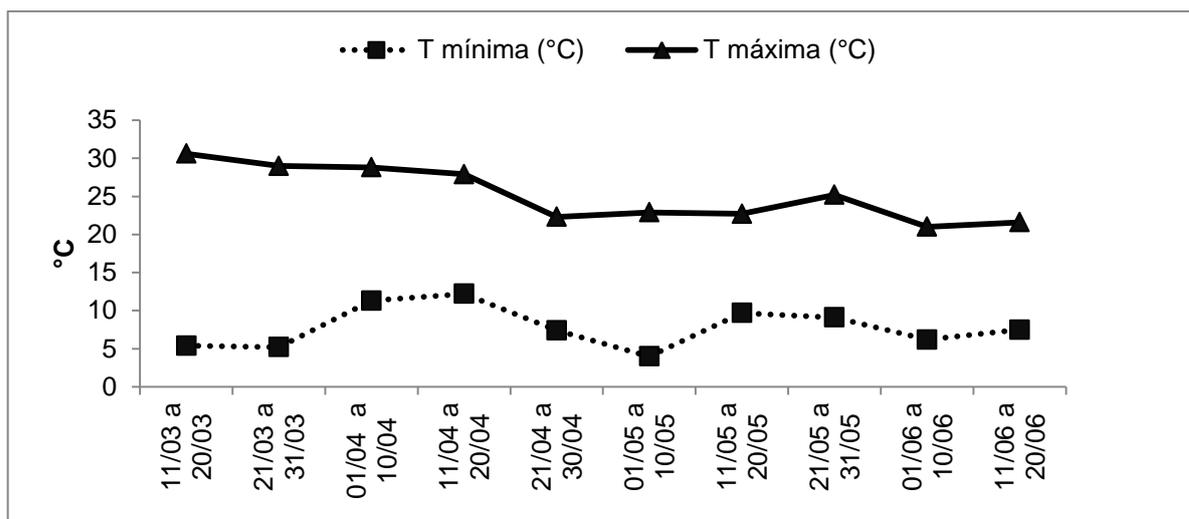


FIGURA 3 - Condições meteorológicas durante o período experimental, 19 de março a 18 de junho de 2012, PR, Brasil.

Treze carneiros das raças Suffolk e Dorper, com $76,4 \pm 34,2$ kg distribuído de acordo com o peso, e produção média diária de fezes frescas de $2,69 \pm 0,94$ kg por animal, foram mantidos em aprisco suspenso ripado sem receber medicamentos por mais de oito meses. A dieta era composta por 44,3 % de concentrado farelado (14% de PB) e 55,7% de volumoso (feno de azevém), segundo o NRC (2007). A dieta foi fornecida *ad libitum*, duas vezes ao dia, com sobra diária de 10% para não limitar o consumo. Destes, oito carneiros receberam uma única aplicação subcutânea de MOX 1% (Cydectin®) na dose de 0,2 mg para cada kg de peso corporal. A dose foi administrada com auxílio de seringa plástica graduada em escala de 0,1 mL, na face interna da coxa direita para padronização do local de aplicação. Após 36 horas de aplicação do fármaco (SANHUEZA, 2006), foram colocadas bolsas coletoras nos animais dosificados e não-dosificados por um período de 24 horas para a coleta de fezes, sendo coletadas a cada 12 horas e armazenadas a 4°C. As coletas foram encerradas 60 horas após a aplicação do anti-helmíntico. As fezes do tratamento controle, sem resíduo de MOX, foram coletadas no mesmo período. Após o término das coletas as fezes foram homogeneizadas manualmente por tratamento.

Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 2x2, fezes com a presença do resíduo de MOX ou não (controle), com ou sem cobertura contra a chuva. O delineamento foi em blocos inteiramente casualizados, com cinco repetições e oito replicatas que correspondiam aos períodos de coletas (0, 4, 8, 12,

24, 36, 60 e 88 dias de exposição ao ambiente). Desta forma, foram pesados oito bolos fecais com 200 g por repetição/tratamento. Estes bolos fecais foram expostos ao ambiente de pastagem, predominantemente de Tifton-85 (*Cynodon spp.*) sobressemeado com Azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), distanciados em 2 m entre os tratamentos dentro dos blocos, 0,5 m entre os dias de exposição e 8 m entre blocos. O local permaneceu sem a presença de fezes de animais por mais de seis meses.

Foi coletado um bolo fecal por repetição e por tratamento. Separaram-se as fezes do mantilho e então pesadas, sendo as amostras armazenadas a -20 °C até posterior determinação da concentração de MOX.

2.2.11 Análise estatística

O delineamento experimental para determinação da taxa de excreção via fezes da moxidectina foi inteiramente casualizado, sendo os animais distribuídos aleatoriamente.

Para o ensaio de persistência da moxidectina no ambiente, as variáveis foram analisadas em blocos inteiramente casualizados e com medidas repetidas no tempo pelo procedimento estatístico MIXED do SAS. O modelo utilizado foi: $Y = \mu + B_i + T_j + P_k + T_j * P_k + e_{ijk}$, em que μ = média, B_i = efeito de bloco (1 a 5), T_j = efeito de tratamento ($i = 1$ a 2), P_k = efeito de dias de avaliação (1 a 8), $T_j * P_k$ = efeito de interação entre tratamentos e dias de avaliação e e_{ij} = erro experimental. Todas as médias foram calculadas utilizando o comando LSMEANS e as comparações entre as médias foram realizadas pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Preparo da amostra

No desenvolvimento do método analítico, levou-se em consideração a rapidez no preparo da amostra. Assim, conforme apresentado na Figura 1, o procedimento de extração do analito compreendeu, unicamente, a extração com ACN, à temperatura ambiente. A co-extração foi realizada visando a obtenção de melhores resultados de recuperação do analito. A ACN foi apropriada por ser um solvente que possui propriedade seletiva para a MOX, tendo sido eficiente pelo fato da matriz fezes apresentar baixos teores de gordura e alto conteúdo de fibras.

2.3.2 Validação do método analítico

O método analítico desenvolvido foi validado, conforme as recomendações do guia de validação do MAPA (2011) e da Comunidade Europeia (EC, 2002), através dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, efeito matriz, precisão intra e interdias, exatidão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).

A seletividade foi avaliada pela ausência de picos interferentes nos tempo de retenção da MOX e EMA. Nenhum interferente foi detectado nos tempos de retenção correspondentes a esses analitos garantindo, assim, a seletividade do método. Na Figura 4 é apresentado o cromatograma da amostra branco de fezes fortificada com MOX e EMA.

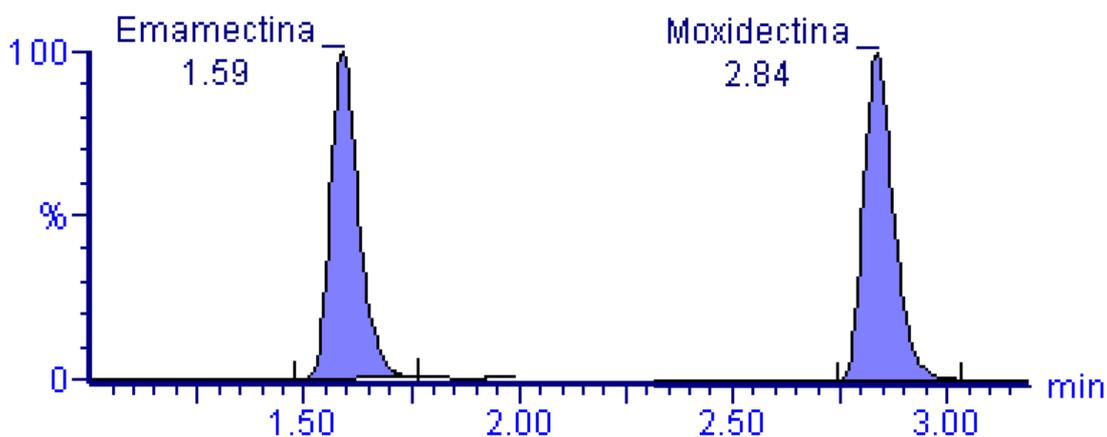


FIGURA 4 - Cromatograma da matriz branco de fezes fortificada com moxidectina (200 ng g^{-1}) e emamectina (40 ng g^{-1}).

As curvas analíticas foram construídas em oito níveis de concentração ($5,0$; $10,0$; $20,0$; $50,0$; $100,0$; $200,0$; $300,0$ e $400,0 \text{ ng g}^{-1}$), para assegurar a maior faixa possível de quantificação da MOX nas fezes de cordeiro. Segundo as recomendações do guia de validação do MAPA (2011), as curvas analíticas devem conter pelo menos cinco níveis de fortificação.

As curvas analíticas matrizadas apresentaram-se lineares na faixa entre 5 - 400 ng g^{-1} para a matriz estudada, com coeficiente de correlação (r) maior que $0,99$ (Figura 5), resultado que está de acordo com o guia de validação da Comunidade Europeia (EC, 2002) e do MAPA (2011). Vale ressaltar que, de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo INMETRO (2003), somente curvas analíticas que apresentem correlação maior que $0,90$ podem ser utilizadas para determinar concentrações em ensaios químicos.

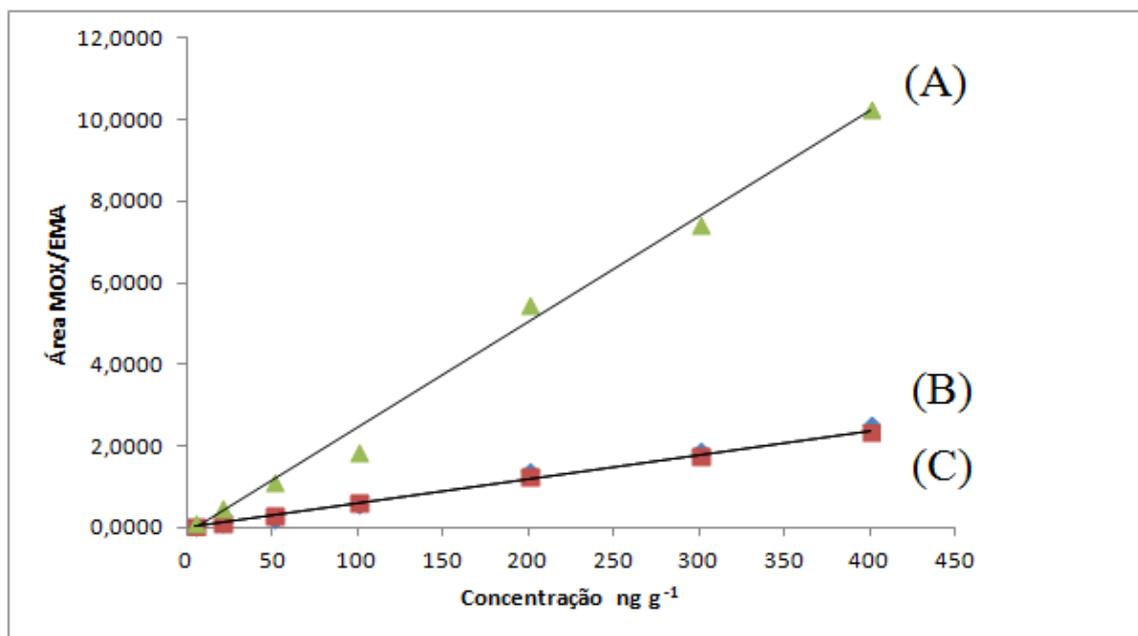


FIGURA 5 - Curvas analíticas da moxidectina (MOX) no solvente (ACN) (A) e extrato (B) e matriz (C) fortificadas.

A sensibilidade do método, obtida através do coeficiente angular da curva analítica, apresentou valor de 0,0065 ua g/ng para MOX.

O efeito matriz foi avaliado através da comparação das áreas dos níveis de concentração da curva analítica no extrato fortificado com os do analito em solvente (Figura 5). Os resultados indicam que a matriz interfere na ionização dos analitos, induzindo perda de sinal. O coeficiente angular da curva no extrato foi significativamente ($p < 0,05$) menor do que o da curva no solvente, haja vista a perda do sinal cromatográfico pela presença da matriz. Assim, a avaliação dos demais parâmetros de validação foi realizada utilizando-se curva analítica matrizada, com adição de padrão interno na matriz (EMA, 40 ng.g⁻¹), o que dá suporte ao processo de validação do método.

As precisões intradia (repetibilidade) e interdias (reprodutibilidade) foram expressas como coeficiente de variação (CV, %) dos resultados obtidos com amostras fortificadas em triplicata. O FDA e a ANVISA recomendam que os resultados não excedam 15% de CV (exceto para o limite de quantificação, o qual não deve exceder 20% do CV). Os valores de CV do método (Tabela 2) encontram-se abaixo do recomendado, indicando que o mesmo é preciso.

A avaliação da exatidão de um método analítico pode ser realizada através da comparação dos resultados obtidos com aqueles obtidos através de outro método

validado ou através da análise de um material de referência certificado. Porém, a indisponibilidade de outro método validado e de material certificado levou à necessidade da aplicação do teste de recuperação para determinação da exatidão. A avaliação da exatidão pelo teste de recuperação é internacionalmente aceita se nenhum material de referência certificado estiver disponível (EC, 2002; MAPA, 2011). Os resultados de exatidão obtidos (85 a 111%) (Tabela 2) estão de acordo com os valores preconizados pelos Guias de Validação do MAPA (2011) e da Comunidade Europeia (EC, 2002), que estabelecem a faixa de 70 a 110%.

O LOD e o LOQ do método foram de $3,0 \text{ ng g}^{-1}$ e $5,0 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente (Tabela 2). Amostras branco ($n = 10$) foram fortificadas com MOX no nível do LOQ e analisadas. Os valores de CV verificados foram de 26,0% (LOD) e 12,4% (LOQ). Vale ressaltar que os valores de CV do LOQ não devem ser maiores do que 20% para concentrações do analito $< 10 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$. Estes dados corroboram a adequabilidade da metodologia desenvolvida no presente trabalho.

Os parâmetros de validação do método desenvolvido, cujos conceitos foram revisadas por Paschoal et al. (2008), são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - Parâmetros de validação do método analítico desenvolvido.

Parâmetros de Validação	
Equação da curva analítica	$y = 0,0065 x - 0,0217$
Linearidade (r)	0,99
LOD (ng g^{-1})	3,0
LOQ (ng g^{-1})	5,0
Exatidão (%) Recuperação	
5 ng g^{-1} (n=3)	85,4
100 ng g^{-1} (n=3)	94,4
200 ng g^{-1} (n=3)	111,8
400 ng g^{-1} (n=3)	108,6
Efeito Matriz (%)	
5 ng g^{-1} (n=3)	89,1
100 ng g^{-1} (n=3)	83,2
200 ng g^{-1} (n=3)	85,5
400 ng g^{-1} (n=3)	85,6
Precisão (CV%) Intradia	
5 ng g^{-1} (n=3)	9,0
100 ng g^{-1} (n=3)	9,4
200 ng g^{-1} (n=3)	9,1
400 ng g^{-1} (n=3)	6,6
Precisão (CV%) Interdia	
5 ng g^{-1} (n=3)	9,2
100 ng g^{-1} (n=3)	6,2
200 ng g^{-1} (n=3)	6,7
400 ng g^{-1} (n=3)	9,4

2.3.3 Cinética de excreção de moxidectina via fezes

Utilizando o método desenvolvido e validado, foram analisadas as amostras do ensaio experimental com cordeiros. A primeira amostra em que o fármaco foi

detectado foi após 12 h do início do tratamento, tendo a concentração da MOX nas fezes aumentado progressivamente até alcançar a concentração máxima ($C_{m\acute{a}x}$) de $22,73 \text{ ng.g}^{-1}$, no tempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) de 39,92 horas (Figura 6). Com relação à extensão da excreção do fármaco, a área sob a curva de concentração-tempo foi de $13292 \text{ ng.g}^{-1}.\text{hora}$. A concentração encontrada nas fezes indica que o fármaco é eliminado principalmente por esta via, conforme já foi descrito por PÉREZ et al. (2001).

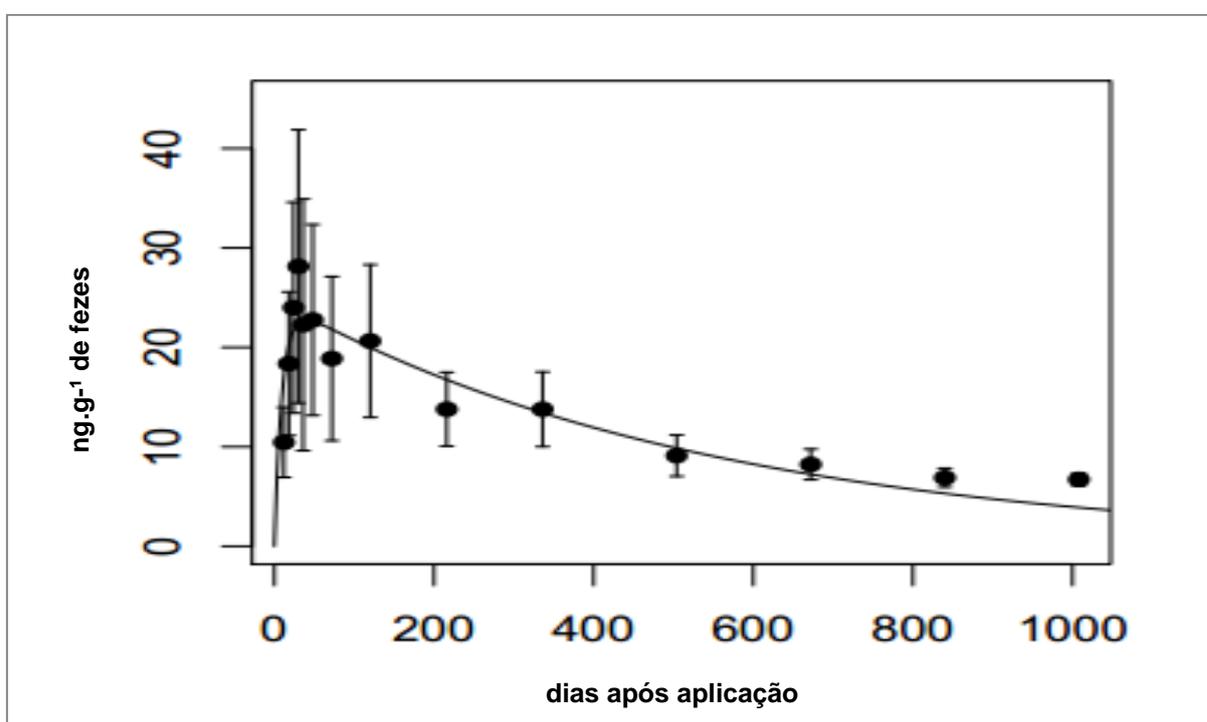


FIGURA 6 - Perfil da concentração de moxidectina nas fezes de cordeiros *versus* tempo, após a administração subcutânea de $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ de peso corpóreo ($n=7$).

Os parâmetros que descrevem a cinética de eliminação da MOX são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 - Parâmetros da cinética de eliminação da moxidextina (MOX) pelas fezes de cordeiro, após administração subcutânea de 0,2 mg kg⁻¹ de peso corpóreo (n = 7).

PARÂMETROS	MOX (Média)
C _{máx} (ng g ⁻¹)	22,73
T _{máx} (horas)	39,92
AUC (ng. horas.g ⁻¹)	13.292
Ke (horas)	0,1025

DP = Desvio Padrão; C_{máx} = concentração máxima; T_{máx} = tempo para alcançar C_{máx}; Ke = taxa de eliminação constante na fase terminal; t_{1/2} = tempo de eliminação de meia vida; AUC = área sob a curva concentração-tempo.

A molécula de MOX apresenta uma massa molecular elevada e elevados valores de coeficientes de partição ($K_{o/w}$), o que a caracteriza como substância lipofílica, permitindo o seu depósito no tecido adiposo. Desta forma, este tecido pode atuar como um reservatório do fármaco, o que contribui para a longa persistência dessa molécula na corrente sanguínea e nos diferentes tecidos-alvos (CRAVEN et al.; 2002; CLEALE et al., 2004). Conseqüentemente, apresenta prolongada excreção via fezes, visto que esta é sua principal via de eliminação. Assim, verificou-se a presença de MOX nas fezes de cordeiros até 42 dias após o tratamento.

A área sob a curva de concentração-tempo (AUC) é geralmente considerada como a mais relevante para a avaliação do grau de exposição à droga. Verificou-se valores maiores, no presente estudo quando comparados com os obtidos por SANHUEZA (2006), 1694,9 e 1179,6 ng.g⁻¹dia, provavelmente a diferença de categoria animal avaliada entre os estudos pode ter colaborado com os resultados. Sugere-se que o menor teor de gordura favoreça a maior eliminação do fármaco, visto que é esse tecido que pode atuar como reservatório da MOX. Entretanto, a T_{máx} de 36 horas foi semelhante entre os estudos. LIFSCHITZ et al. (1999), obtiveram concentração máxima de 149 ng.g⁻¹ em bovinos tratados com MOX (0,2 mg. kg⁻¹ por via subcutânea). Outros valores de C_{máx} mais próximos aos encontrados neste

estudo foram verificados por LIFSCHITZ et al. (2002) em bovinos tratados com ivermectina e doramectina (115 e 258 ng.g^{-1} , respectivamente).

2.3.4 Persistência da moxidectina presente nas fezes de cordeiros no ambiente.

Na Figura 7 são apresentadas as médias e os desvios padrão (ng.g^{-1} peso seco) das concentrações de MOX nos bolos fecais (200 g de peso úmido) coletados no tempo máximo de excreção do vermífugo, expostos ao ambiente por até 88 dias. Os resultados confirmam as características físicas e químicas, a MOX apresenta limitada movimentação no ambiente, mínima capacidade de lixiviação e alta afinidade com a matéria orgânica, bem como alta sorção para as fezes e o solo (CELESTINA et al., 2010). O momento da coleta coincidiu com o tempo máximo de excreção da MOX, visto que a concentração verificada de $35,94 \pm 2,96$ e $38,50 \pm 4,71 \text{ ng.g}^{-1}$, para ambos os tratamentos com ou sem cobertura contra a chuva, respectivamente, foi semelhante a concentração obtida no estudo da cinética de excreção do vermífugo ($32,45 \text{ ng.g}^{-1}$).

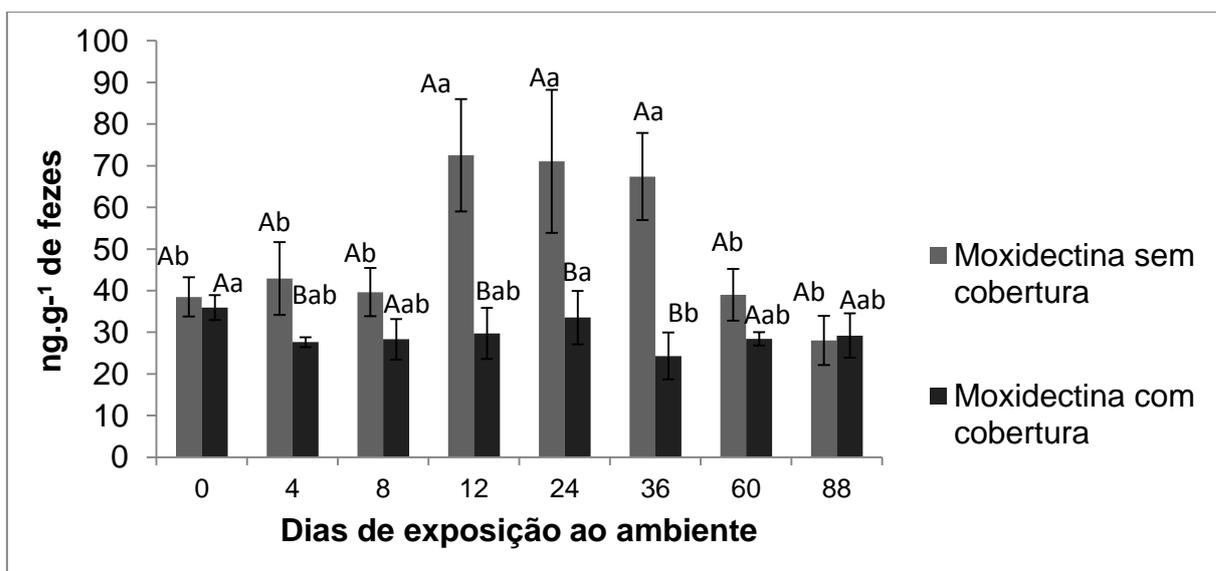


FIGURA 7 - As letras maiúsculas se referem à comparação entre os tratamentos e as letras minúsculas se referem à comparação entre os dias de exposição ao ambiente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

O isolamento ou não do bolo fecal contra a chuva não interferiu na degradabilidade ou percolação da molécula ($P>0,05$), pois a porcentagem degradada foi de 17,61% e 27,14%, respectivamente. SUÁREZ et al. (2009) obtiveram valores de excreção de MOX em bovinos de 645 ng.g^{-1} , 20 vezes maior aos verificados neste estudo (160 ng.g^{-1}) após 42 dias no campo. Os autores verificaram taxa de degradação de 75% do resíduo de MOX, aos 42 dias de exposição.

Desta forma, a moxidectina apresentou alta persistência no ambiente, o que pode proporcionar maior tempo de ação desta molécula à fauna coprófaga. Entretanto, devido à maior sorção nas fezes, estas podem ser incorporadas ao solo, juntamente com a matéria orgânica. Ao avaliar a quantidade de moxidectina no bolo fecal, observou-se que no início do experimento os bolos fecais possuíam em média 67,11g de fezes secas e 2302,15 e 2443,57 ng de moxidectina, para os tratamentos com ou sem cobertura contra a chuva, respectivamente. Com o passar do tempo verificou-se que houve perda de matéria seca de fezes, conseqüentemente, redução na quantidade de peso seco de fezes (25,33 e 18,11g) e de moxidectina (729,16 e 506,34 ng) nas fezes, para ambos os tratamentos com ou sem cobertura contra chuva, respectivamente. Contudo, a quantidade final de moxidectina não foi afetada pela presença da chuva, confirmando a menor solubilidade da molécula à água.

Ao avaliar a degradação de abamectina e doramectina no solo e nas fezes de ovinos em condições ambientais do dia seis ao dia 70 pós-tratamento, ERZEN et al. (2005) verificaram quantidades elevadas de abamectina ($800 \pm 46 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ de MS) nas fezes no sexto dia após o tratamento. Os autores verificaram que as concentrações permaneceram elevadas até aos 70 dias após o tratamento ($213 \pm 10 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ de MS de fezes). Entretanto, ao considerar apenas o solo, a concentração foi muito baixa, permanecendo próxima à zero, cuja média foi de $0,69 \pm 0,13 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ de MS de solo (ERZEN et al., 2005). Entretanto, ao serem utilizadas como adubo e misturadas ao solo, as concentrações nesse ambiente podem ser maiores, pois a MOX, também, adere fortemente à matéria orgânica.

As fezes que não foram cobertas contra a chuva apresentaram aumento nas concentrações de MOX de até 53% aos 12 dias de exposição, em relação à concentração inicial. Foi observado aumento nas concentrações nos dias 12, 24 e 36 dias, correspondendo os períodos posteriores às incidências maiores de chuva

(21/04 a 30/04), Após esse período a diminuição da concentração de MOX nas amostras sem cobertura poderá ser devida à degradação da molécula como consequência de fatores ambientais (ex. foto-oxidação), cuja radiação média para os meses de abril a maio foi de $5,2 \pm 1,8$ w/m².

Esse aumento foi verificado por outros autores que avaliaram a concentração de doramectina exposta ao ambiente (CELESTINA et al., 2010). Estes autores relataram que a elevação na concentração aconteceu em amostras coletadas logo após a precipitação, semelhante aos verificados neste estudo. Um similar aumento foi observado por KOLAR & KOŽUH ERŽEN (2007) quando homogeneizaram amostras de fezes de animais tratadas com doramectina e abamectina e expuseram em uma fina camada na pastagem. A elevação foi de 52 e 32% no final do período experimental para abamectina e doramectina, respectivamente. SUÁREZ et al. (2009), verificaram comportamento semelhante para a MOX e a doramectina. A presença de chuvas foi reportada pelos autores, mas os mesmos não discutiram a relação da chuva com o aumento na concentração dos antiparasitários. Entretanto, cabe mencionar que esse aumento na concentração de MOX nas fezes dos cordeiros e das avermectinas (ivermectina, abamectina e doramectina) nas fezes de bovinos, expostas em ambiente de pastagem, pode ser devido à perda de componentes solúveis das fezes como consequência da chuva.

2.4 CONCLUSÕES

O método analítico desenvolvido e validado, utilizando cromatografia líquida de ultra-alta pressão com detecção por espectrometria de massas (UPLC-MS/MS QqQ), mostrou-se adequado para identificação e quantificação da MOX em fezes de cordeiro.

A excreção de moxidectina apresentou comportamento prolongado, com a verificação da presença da molécula até aos 42 dias após a aplicação. O pico de excreção foi verificado às 36 h, cujas concentrações mostraram-se inferiores às verificadas na literatura para animais adultos.

Ao ser exposta ao ambiente, a molécula de MOX apresentou elevada persistência no ambiente até os 88 dias, com alta sorção nas fezes e baixa degradabilidade ambiental. Desta forma, ao considerar o bolo fecal, os organismo que utilizam estas fezes teriam maior exposição à molécula, por outro lado, a percolação desta molécula sendo baixa diminuiu a possibilidade de contaminação do lençol freático.

REFERÊNCIAS

ABIEC- Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes, Pecuária brasileira. Disponível em http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp. Acessada em 30.10.2013.

ALMEIDA, M.A.O.; AYRES, M.C.C. **Considerações sobre anti-helmínticos**. In: Spinosa, H.S. et al. Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 459-466, 2002.

ANZIANI, O.S.; FLORES, S.G.; GUGLIOELMONE, A.A. Activity of injectable doramectin against *Haematobia irritans* in cattle. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 9, p. 115–118, 2001.

BERNAL, J.L.; NOZAL, M.J.; SALAS, M.; GALANTE, E.; LUMARE, J.P. HPLC Determination of Residual Ivermectin in Cattle Dung Following Subcutaneous Injection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.17, p. 2429-2444, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 24. Anexo II: Guia para Validação de Métodos Analíticos e Controle de Qualidade Interna das Análises de Monitoramento do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC. Diário Oficial, nº 138, jul. 2011. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arg_editor/file/Organizacao_Procedimentos_RCA.pdf Acessada em: 29.10.2013.

BUENO, M.S.; CUNHA, E.A. da; SANTOS, L.E. dos; RODA, D.S.; LEINZ, F.F. Características de carcaças de cordeiros Suffolk abatidos em diferentes idades. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 29, p. 1803-1810, 2000.

CELESTINA, T.V.; KOLAR, L.; GOBEC, I.; KUŽNER, J.; FLAJS, V.C.; POGAČNIK, M.; ERŽEN, N.K. Factors influencing dissipation of avermectins in sheep faeces. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 73, p. 18-23, 2010.

CLEALE, R.M.; HART, K.B.; HUTCHENS, D.E.; JOHNSON, E.G.; PAUL, A.J.; SMITH, L.L.; TUCKER, C.; YAZWINSKI, T.A.; DOSCHER, M.E.; GRUBBS, S.T.; WULSTER-RADCLIFFE, D.M.; AMODIE, D.M. Effects of subcutaneous injections of a long acting moxidectin formulation in grazing beef cattle on parasite fecal egg reduction and animal weight gain. **Veterinary Parasitology**. v. 126, p. 325-338, 2004.

CRAVEN, J.; BJORN, H.; HENNESSY, D.R.; FRIIS, C. The effects of body composition on the pharmacokinetics of subcutaneously injected ivermectin and moxidectin in pigs. **Pharmacokinetics**, v. 25, p. 227-232, 2002.

DUPUY, J.; CHARTIER, C.; SUTRA, J.F.; ALVINERIE, M. Eprinomectin in dairy goats: dose influence on plasma levels and excretion in milk. **Parasitology Research**. v. 87, p. 294–298, 2001.

EC, 2002. European Commission. Commission Decision of 12 August 2002. "Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results". *Official Journal of the European Communities*, 17/08/2002, L221/8-36. Disponível em <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/vet_mrl_search.jsp&murl=menus/regulations/regulations.jsp&mid=WC0b01ac058006488e>. Acessada em: 16.06.2011.

EDWARDS, C.A.; ATIYEH, R.M.; ROMBTE, J. Environment Impact of Avermectins. **Reviews of Environment Contamination and Toxicology**. v. 171, p. 111-137, 2001.

FLOATE, K.D.; SPOONER, R., COLWELLI, D. Larvicidal activity of endectocides against pest flies in the dung of treated cattle. **Medicine Veterinary Entomology**. v. 15, p. 117–120, 2001.

FLOATE, K.D.; WARDHAUGH, K.G.; BOXALL, A.B.A.; SHERRATT, T.N. Fecal Residues of Veterinary Parasiticides: Nontarget effects in the pasture environment. **Annual Reviews Entomology**. v. 50, p. 153- 179, 2005.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 36p, 2003.

KOLAR, L.; KOŽUH ERŽEN, N. Degradation of abamectin and doramectin in sheep faeces under different experimental conditions. **International Journal of Environment and Pollution**. v. 31, p. 22–33, 2007.

LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; IMPERIALE, F.; SUTRA, J.F.; GALTIER, P.; LANUSSE, C.; ALVINERIE, M. Moxidectin in cattle: correlation between plasma and target tissue disposition. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 22, p. 266-273, 1999.

LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; SALLOVITZ, J.; IMPERIALE F.; PIS, A.; LANUSSE, C. Loperamide-induced enhancement of moxidectin availability in cattle. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 25 p. 111–120, 2002.

MAPA. PORTARIA Nº 577, DE 27 DE DEZEMBRO DE 2010. Nº 6 – 10/01/11 – Seção 1 - p.9. Disponível em: ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpssp/bibliote/informe_eletronico/2011/iels.jan.11/iels06/U_PT-MAPA-SDA-577_271210.pdf. Acessada em: 30.10.2013.

MAPA. Caprinocultura e ovinocultura. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprilos-e-ovinos>. Acessada em: 30.10.2013.

MULROY, A. Monitoring and Analysis of Water and Wastes. **Water Environment Technology**. v. 13, n. 2, p. 32-36, 2001.

NRC, **Nutrient requirements of small ruminants:sheep, goats, cervids and new world camelids**. Washington: National Academy Press, 2007. 362pp.

PASCHOAL, J.A.R; RATH, S.; AIROLDI, F.P da S.; REYES, F.G.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. v. 31, 1190-1198, 2008.

PÉREZ, R.; CABEZAS, I.; GODOY, C.; RUBILAR, L.; DÍAZ, L.; MUÑOZ, L.; ARBOIX, M.; ALVINIERIE, M. Disposición plasmática y fecal de moxidectina administrada por vía oral en caballos. **Archivos de Medicina Veterinaria**. v. 33, p. 77-88, 2001.

PÉREZ, R.; GODOY, C.; PALMA, C.; MUNOZ, L.; ARBOIX, M.; ALVINIERIE, M. Plasma disposition and fecal elimination of doramectin after oral or intramuscular administration in horses. **Veterinary Parasitology**. v. 170, p. 112–119, 2010.

SANHUEZA, C.E.N. Comparación del perfil de excreción fecal de moxidectina luego de la administración subcutánea em ovinos con y sin parasitismo gastrointestinal. Universidade de Concepción (Chile). Facultad de Medicina Veterinaria Departamento de Ciencias Clínicas. Ed.: Universidad de Concepción, 2006.

SHOOP, W.L.; MROZIK, H.; FISHER, M. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Veterinary Parasitology**. v. 59, p. 139-156, 1995.

SINDAN - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. Mercado veterinário por classe terapêutico e espécie animal. São Paulo, SP. Disponível em: <http://www.sindan.org.br>. Acessada em: 30.10.2013.

SUÁREZ, V.H.; LIFSCHITZ, A.L.; SALLOVITZ, J.M.; LANUSSE, C.E. Effects of faecal residues of moxidectin and doramectin on the activity of arthropods in cattle dung, **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 72, p. 1551-1558, 2009.

3. IMPACTO DA MOXIDECTINA ELIMINADA NAS FEZES DE OVINOS SOBRE A FAUNA COPRÓFAGA E A DECOMPOSIÇÃO DO BOLO FECAL EM PASTAGENS TÍPICAS DO SUL DO BRASIL

RESUMO

A fauna coprófaga é essencial para o enriquecimento do solo por realizar a decomposição das fezes e a ciclagem de nutrientes. Além disso, mantém o balanço entre os organismos no solo. Os anti-helmínticos, excretados ao ambiente, possuem persistência elevada nas fezes, a qual pode afetar a coprofauna, conseqüentemente, a diversidade ambiental. O objetivo foi investigar a degradação dos bolos fecais de ovinos, em pastagens do Sul do Brasil; bem como a toxicidade do anti-helmíntico moxidectina sob a densidade populacional da fauna coprófaga (Diptera, Hymenoptera and Coleoptera) até 88 dias de exposição ao ambiente. Este estudo foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Ovinos e Caprinos da UFPR, Brasil. Treze carneiros das raças Suffolk e Dorper com $76,43 \pm 34,24$ kg de peso corporal foram divididos em delineamento blocos casualizados, em dois grupos, controle e tratados com moxidectina. Para este grupo foi administrada uma única dose subcutânea de 0,2 mg/kg. peso corporal de moxidectina (Cydectin®). As fezes foram coletadas no pico de excreção da moxidectina entre 36 e 60 horas após a aplicação, utilizando bolsas coletoras de fezes. Bolos fecais (200 g) do grupo controle ou do contaminado foram distribuídos aleatoriamente no ambiente isolado por mais de seis meses, em oito repetições. As fezes de ambos os tratamentos foram avaliadas com ou sem cobertura contra a chuva até 88 dias de exposição ao ambiente. Os dipteros foram coletados por meio do puçá duas vezes ao dia até o 10º dia, dias alternados até o 20º dia, a cada 4 dias até o 40º dia e a cada 8 dias até 88º dia experimental. A metodologia de armadilha de queda (*pitfall*) foi utilizada para coleta nos 10 primeiros dias, das famílias Diptera, Hymenoptera e Coleoptera. A coleta direta da família Coleoptera foi realizada 4, 8, 12, 24, 24, 36, 60 e 88 dias de exposição ao ambiente. Adicionalmente, analisou-se o peso seco (g), % carbono e % nitrogênio. O resíduo de moxidectina presente nas fezes não afetou o número de indivíduos. Entretanto, a degradação das fezes expostas ao ambiente diferiu entre os tratamentos, sendo que para o tratamento controle apresentaram maior peso seco em comparação com o tratamento moxidectina. Para ambos os tratamentos, a cobertura contra a chuva reduziu a decomposição das fezes. As porcentagens de Nitrogênio e Carbono não diferiram entre os tratamentos com ou sem cobertura. Entretanto, nos bolos fecais do tratamento moxidectina foi observada maior % de nitrogênio e menor % de carbono que o tratamento controle. O anti-helmíntico moxidectina, nas doses avaliadas, não proporcionou efeito tóxico à fauna coprófaga, ao passo que, aumentou a decomposição do bolo fecal com a presença do fármaco.

Palavra-chaves: Anti-helmínticos, Coleoptera, Diptera, Hemynoptera, toxicidade.

IMPACT OF THE ELIMINATED MOXIDECTIN IN THE SHEEP FEACES UPON COPROFAUNE AND DECOMPOSITION DUNG IN PASTURE TYPICAL OF SOUTH BRAZIL

ABSTRACT

Dung fauna is essential to enrich the soil through decomposition of faeces and nutrients cycling. Further, they keep the balance among the populations in this environment and soil. Anthelmintics have long persistence with a long half-life in faeces. This may affect the coprofauna, e.g. the environmental system diversity. The aim of our work was to investigate the degradation of moxidectin and dung pats on sheep grazed pasture over 88 days, as well as to evaluate the toxicity of moxidectin anthelmintic on the dung fauna (Diptera, Hymenoptera and Coleoptera) population. This study was conducted at the Sheep and Goats Research Laboratory of the Federal University of Paraná, Brazil. Thirteen rams were separated in 2 groups, untreated and moxidectin treated. The latter group was administrated one single subcutaneous dose of moxidectin (Cydectin®) at a rate of 0.2 mg/kg body weight. Faeces were collected on excretion peak of moxidectin at 36 h to 60 h after application using collection bags. Two hundred grams of dosed or undosed sheep with five replicates for each treatment were placed in a field not grazed for more than 6 months with or without coverage against rain. Dung Diptera were collected using an insect net twice a day until day 10, every other day from day 11 to day 20, every 4 days from day 21 until day 40 and every 8 days thereafter. The pitfall methodology was used to dung Diptera, Hymenoptera and Coleoptera collected with three pitfalls in each replicated until 10 first days. Dung Coleoptera as collected and moxidectin concentration was analysed in fecal paths after 0, 4, 8, 12, 24, 36, 60 and 88 days of field exposure. In addition, dung was analyzed for dry matter (DM), carbon (C) and nitrogen (N) percentage. Moxidectin treated feces did not reduce fauna dung numbers of any species collected. However, feces from undosed animals degraded slower than moxidectin treated feces. For both, the treatments the protected against rain decreased dung decomposition. Rain protection did not affect N and C percentages, independent of moxidectin treatments. However, moxidectin treated dung pats had greater N and lower C percentages than untreated ones. Moxidectin did not affect the environment in this specific study, whereas, it was observed increased dung decomposition with presence of the drug.

Key-words: Anthelmintics, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, residue, environment

3.1 INTRODUÇÃO

A moxidectina (MOX) é uma milbemicina obtida pela modificação química da nemadectina, componente natural produzida pela actinobactéria *Streptomyces cyanogriseus* em condições controladas (TAKIGUSHI et al., 1980). Os anti-helmínticos milbemicina possuem amplo espectro contra ecto e endoparasitas em animais (CAMPBELL, 1989; LIFSCHITZ et al., 2002; NJUE et al., 2004).

Milbemicinas são substâncias altamente lipofílicas solúveis em solventes orgânicos, sendo a solubilidade em água de 4.3 mg.L⁻¹. A sua alta lipofilicidade representa uma distribuição tecidual ampla e com longa permanência no plasma, e permite que essas substâncias ultrapassem as barreiras celulares (LANUSSE et al., 1997). Após à aplicação, estes fármacos armazenados principalmente no fígado e no tecido adiposo (MOLENTO et al., 2004). Na maioria dos casos, eles são pouco metabolizados no organismo, sendo excretados metabólitos ativos (McKELLAR & BENCHAOUI, 1996; LUMARET & ERROUISSI, 2002). A excreção fecal é a principal via de eliminação, representando 50 a 90% da dose de administração, sendo a excreção via urina inferior a 1% da dose de administração (MULROY, 2001). A formulação, a dose e a via de administração do fármaco podem determinar a sua persistência, potencialidade e ecotoxicidade (HERD, 1995). Estas substâncias ligam-se fortemente às fezes e apresentam persistência prolongada com uma meia-vida longa nas fezes, embora as taxas de degradação sejam fortemente dependentes das condições ambientais (HERD, 1995). Conseqüentemente, podem afetar a fauna coprófaga, e interferir na diversidade ambiental.

O conhecimento do perfil de eliminação a partir de animais tratados, a velocidade de degradação e a distribuição de milbemicinas no ambiente, especialmente em pastagens, é necessário, uma vez que este fármaco pode ter efeitos tóxicos para fauna coprófaga, afetando a decomposição das fezes e a ciclagem de nutrientes.

A moxidectina tem sido reportada como inofensiva para os insetos, principalmente aos besouros (FINCHER & WANG, 1992; STRONG & WALL, 1994; WARDHAUGH et al, 1996; FLOATE et al., 2001, 2002). Entretanto, outros estudos têm demonstrado que a MOX pode afetar a fauna coprófaga. DOHERTY et al. (1994) verificaram a ação larvicida da moxidectina *in-vitro* contra *Onthophagus*

gazella (Coleoptera) e *Haematobia irritans exigua* (diptera), utilizando concentrações crescentes desse resíduo em fezes (4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 e 512 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de fezes).

A maioria das pesquisas sobre impacto de anti-helmínticos no ambiente foi realizada no hemisfério norte, sendo poucas no hemisfério sul. Na Argentina, alguns poucos estudos que estimaram os efeitos da avermectina na colonização e dispersão nos bolos fecais de bovinos (SUÁREZ et al., 2002). Após 21 dias de exposição no campo, as fezes coletadas de animais desverminados de 3 a 28 dias, o número total de artrópodos do grupo controle foi superior aos grupos que continham ivermectina e doramectina. O decréscimo na quantidade de larvas de coleópteros e dípteros foi verificada em bolos fecais com a presença de ivermectina e doramectina expostas ao ambiente até os 21 dias (SUÁREZ et al., 2003). SUÁREZ et al. (2009) estudaram os efeitos da doramectina e moxidectina na fauna coprófaga. O total de artrópodos foi superior para o tratamento controle em comparação aos outros grupos. Para as fezes com doramectina coletadas de animais após 21 dias da desverminação, o número de insetos coletados no bolo fecal foi menor que os dos outros grupos (controle e moxidectina).

No Brasil, poucas foram as pesquisas realizadas sobre este assunto. As populações de insetos e, particularmente, a sensibilidade aos endectocidas podem diferir entre localizações geográficas. Isso demonstra a necessidade de mais estudos nessas regiões. Assim, os objetivos deste trabalho foram investigar a toxicidade da moxidectina presente no bolo fecal de carneiro sobre a fauna coprófaga até os 88 dias de exposição ao ambiente, bem como a decomposição destes bolos fecais, em pastagem típica do sul do Brasil.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo de campo foi conduzido no Laboratório de Produção e Pesquisa em Ovinos e Caprinos da Universidade Federal do Paraná, LAPOC-UFPR (Brasil), entre março e junho de 2012. (25°25'S; 49°8'W, 915 m altitude). O solo da área experimental é classificado como Cambissolo, compreendendo solos minerais, não-

hidromórficos, pouco desenvolvidos e medianamente profundos. A textura é média argilosa em relevo suave ondulado. As condições climáticas podem ser caracterizadas típicas para outono e inverno do sul do Brasil (Cfb) (Figura 8 e 9).

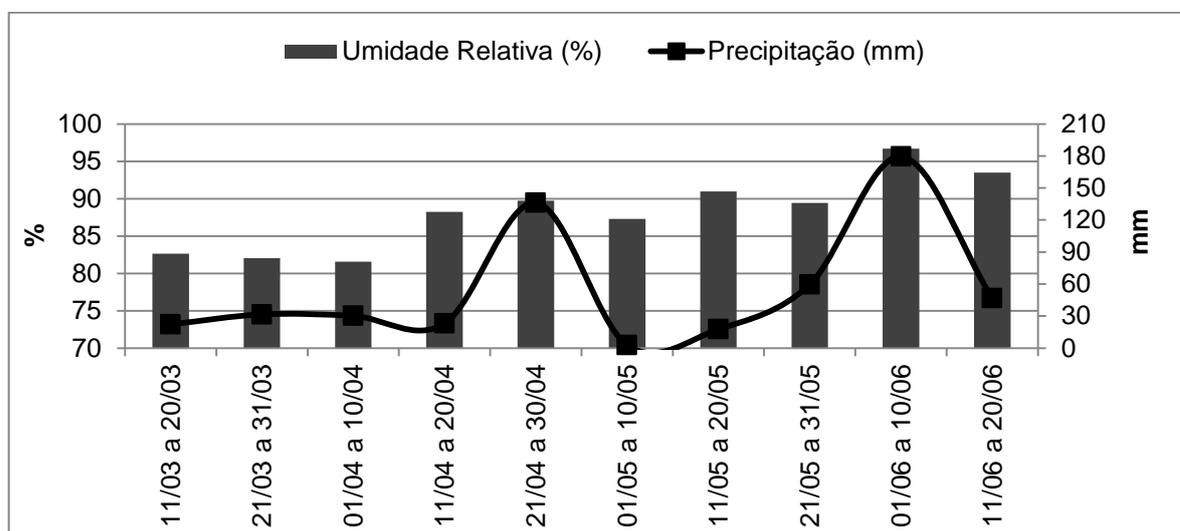


FIGURA 8 – Condições meteorológicas durante o período experimental, 19 de março a 18 de junho, PR, Brasil.

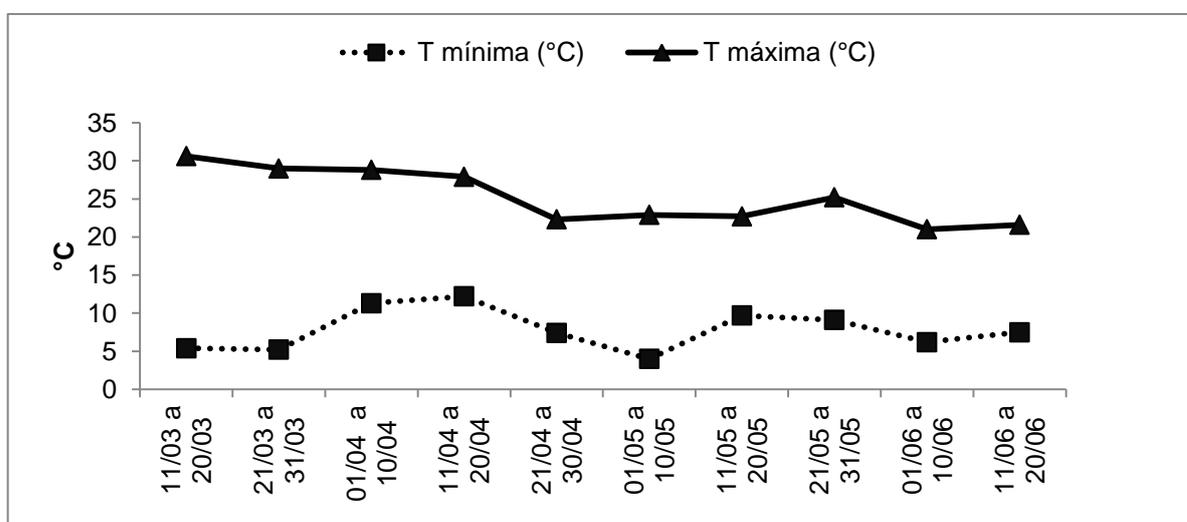


FIGURA 9 - Condições meteorológicas durante o período experimental, 19 de março a 18 de junho, PR, Brasil.

3.2.1 Delineamento experimental

Treze carneiros das raças Suffolk e Dorper, com $76,4 \pm 34,2$ kg e produção média diária de fezes frescas de $2,69 \pm 0,94$ kg por animal, foram mantidos em

aprisco suspenso ripado sem receber medicamentos previamente por mais de oito meses. A dieta era composta por 44,3 % de concentrado farelado (14% de PB) e 55,7% de volumoso (feno de azevém), segundo o NRC (2007). A dieta foi fornecida *ad libitum*, duas vezes ao dia, com sobra diária de 10% para não limitar o consumo. Destes, oito carneiros receberam uma única aplicação subcutânea de MOX 1% (Cydectin®) na dose de 0,2 mg para cada kg de peso corporal. A dose foi administrada com auxílio de seringa plástica graduada em escala de 0,1 mL, na face interna da coxa direita para padronização do local de aplicação. Ao redor do tempo de máxima eliminação do fármaco, 36 h após aplicação do mesmo (SANHUEZA, 2006), foram colocadas bolsas coletoras nos animais dosificados e não-dosificados por um período de 24 h para a coleta de fezes, sendo coletadas a cada 12 h e armazenadas a 4°C. As coletas foram encerradas 60 h após a aplicação do anti-helmíntico. As fezes do tratamento controle, sem resíduo de moxidectina, foram coletadas no mesmo período. Após o término das coletas (19 de março de 2012 – dia 0), as fezes foram homogeneizadas por tratamento.

Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 2x2, fezes com a presença do resíduo de MOX ou não (controle), com ou sem cobertura contra a chuva. O delineamento foi em blocos completos casualizados, com cinco repetições e oito replicatas que correspondiam aos períodos de coletas (0, 4, 8, 12, 24, 36, 60 e 88 dias de exposição ao ambiente). Desta forma, foram pesados oito bolos fecais matéria fresca com 200g por repetição/tratamento. Estes bolos fecais foram depositados na superfície do solo em ambiente de pastagem, predominantemente de Tifton-85 (*Cynodon* spp.) sobressemeado com Azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), distanciados em 2 m entre os tratamentos dentro dos blocos, 0,5 m entre os dias de exposição e 8 m entre blocos. O local permaneceu sem a presença de fezes de animais por mais de seis meses.

Os dípteros foram coletados por meio do puçá duas vezes ao dia até o 10º dia, dias alternados até o 20º dia, a cada 4 dias até o 40º dia e a cada 8 dias até 88º dia experimental.

A metodologia de captura por armadilhas de queda (*pitfall*) foi utilizada para coleta nos dez primeiros dias, das ordens Diptera, Hymenoptera e Coleoptera. Foram confeccionadas três armadilhas do tipo pitfall de frascos de polietileno com capacidade 500 mL. No dia 0, em cada armadilha, 15 g de fezes frescas do

tratamento controle ou contaminado foram apoiados por um fio fino, em dois pontos opostos e fixados no recipiente. A proteção contra a chuva foi colocada acima da armadilha, formada por uma placa de alumínio apoiada por hastes de madeira.

A coleta direta das ordens Coleoptera e Hymenoptera foi realizada 4, 8, 12, 24, 36, 60 e 88 dias de exposição ao ambiente.

3.2.2 Decomposição das fezes

Os bolos fecais foram coletados integralmente de forma manual, nos dias 0, 4, 8, 12, 24, 36, 60 e 88 de exposição ao ambiente. As fezes foram separadas do mantilho e pesadas em balança eletrônica com precisão de 5 g e conservadas a -18 °C para posterior determinação do peso seco e, das porcentagens de carbono (C) e nitrogênio (N). Para tanto, as amostras foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 h.

As porcentagens de C e N foram obtidas pelo método de combustão seca (975 °C), utilizando o equipamento Vario EL II analyzer (Elementar Analysensystem e GmbH, Hanau, Germany), detectando o C na forma de CO₂. A detecção limite de C e N foi de 0,4 µg e 1 mg, respectivamente. As análises foram realizadas no Laboratório de Biogeoquímica da Universidade Federal do Paraná, Brasil.

3.2.3 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis pelo programa estatístico R (versão 2.12.1). O peso seco, porcentagens de C e N dos bolos fecais foram analisados por medidas repetidas no tempo por meio do procedimento MIXED do SAS (2002), conforme o modelo: $Y = \mu + B_i + T_j + D_k + T_j \times D_k + e_{ijk}$, onde μ = média geral, B_i = efeito de bloco ($i = 1$ a 5), T_j = efeito de tratamento ($j = 1$ a 4), D_k = efeito dos dias de coleta ($j = d 0, d 4, d 8, d 12, d 24, d 36, d 60$ ou $d 88$), $T_j \times D_k$ = interação entre tratamento e dias de coletas, e e_{ijk} = erro experimental. A estrutura

de covariância com o melhor ajuste foi a Auto-regressive. O procedimento LSMEANS foi utilizado para gerar as médias dos tratamentos e as diferenças foram declaradas significativa a 5% de probabilidade. Contrastes ortogonais foram realizados: controle com vs sem cobertura contra a chuva; moxidectina tratados com vs sem cobertura contra a chuva, e controle vs moxidectina tratada.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Fauna Coprófaga

Foram coletados 4.245 Dipteras, sendo 1.696 nos bolos fecais do tratamento controle e 2.739 nos contaminados – pelas metodologias do puçá e do pitfall até 88 dias de exposição ao ambiente. A família Sphaeroceridea foi a mais abundante durante todo período experimental com 3.897 indivíduos coletados (1.482 no controle e 2.415 no contaminado, sendo 1.007 e 1.932 nos primeiros dez dias). Muscidae, Sarcophagidae, Sepsidae e Chrolopidae foram outras famílias identificadas com maior frequência (Tabela 4). Athomyzidae, Tachnidae, Platystomatidae, Ephydriidae, Lauxaniidae, Lepidoptera e Chironomidae foram coletadas, com menor frequência pela metodologia do puçá (Tabela 5) e, Sepsidae, Chironomidae, Lauxaniidae, Shyrphidae, Phoridae, Tipulidae, Mycetophilidae e Ephydriidae pela metodologia da utilização de armadilhas “pitfall”. A moxidectina não reduziu o número de indivíduos da ordem Diptera ($P > 0,05$), bem como não reduziu o número de indivíduos ($P > 0,05$) dentro de cada família identificada.

TABELA 4 – Efeitos da moxidectina sobre o número de dipteros nas fezes de carneiros com ou sem cobertura contra a chuva, utilizando a metodologia de coleta puçá, 19 de março e 18 de junho de 2012, PR, Curitiba, Brasil

Puçá		Tratamento								p-valor
		Sem cobertura contra chuva				Com cobertura contra chuva				
		Controle		Moxidectina		Controle		Moxidectina		
Insecta	Diptera	M _e	\bar{X}	M _e	\bar{X}	M _e	\bar{X}	M _e	\bar{X}	
	Sphaeroceridae	153	145	278	228	79	74	151	137	0,134
	Sarcophagidae	4	4	6	5	2	2	4	3	0,479
	Muscidae	3	4	9	8	2	2	5	7	0,057
	Chloropidae	1	2	1	2	1	1	2	2	0,627
	Ulidiidae	1	1	2	2	0	1	1	1	0,573
	Sepsidae	0b	0b	3a	4a	1ab	2ab	2ab	2ab	0,015*
	Bibionidae	0	0	0	0	1	1	1	1	0,091
	Dolichopodidae	2	2	1	2	1	1	0	0	0,137
	Phoridae	0	0	0	0	1	1	0	0	0,190
	Syrphidae	1	2	1	1	0	0	2	2	0,199

*p-valor significativo(P< 0,05) pelo teste de Kruskal-Wallis

Foram observadas 251 e 327 formigas coletadas nos bolos fecais até 88 dias de exposição ao ambiente para o tratamento controle e moxidectina, respectivamente. Os gêneros *Pheidole*, *Dorymyrmex* e *Acromyrmex* foram as mais abundantes. *Pheidole*, principalmente, *Dorymyrmex*, *Acromyrmex*, *Camponotus*, *Linepithema*, *Pachycondyla* e *Brachymyrmex* foram os gêneros com o maior número de indivíduos coletados pela metodologia do pitfall (Tabela 6). Outros gêneros como, *Dolichoderus*, *Azteca*, *Hipoponera*, *Pseudomyrmex*, *Solenopsis* e *Nylanderia* foram coletados, entretanto, em menor número. Nas coletas de contagem direta foi verificado o maior número de indivíduos dos gêneros *Pheidole*, *Acromyrmex*, *Solenopsis* e *Hipoponera*. Para *Pheidole* e *Solenopsis* foram observadas a presença de formigueiros nos bolos fecais (Tabela 6). *Camponotus*, *Linepithema*, *Brachymyrmex*, *Nylanderia*, *Azteca* e *Dorymyrmex* foram encontrados em menor quantidade. Não houve efeito significativo ($P>0,05$) da presença da moxidectina nas fezes de carneiros sobre a família Formicidae.

Vinte e seis coleópteros, vinte do tratamento controle e seis da moxidectina, observados, sendo *Ataenius* and *Labarrus pseudolivus* os mais abundantes. Os gêneros *Onthophagus*, *Ontherus*, *Canthon*, *Dichotomius* e *Iarupea* também foram observados, porém em menor número. Para os coleópteros, não houve efeito da presença de moxidectina ($P>0,05$), nas fezes de carneiros (Tabela 7).

TABELA 5 – Efeito da moxidectina nas fezes de carneiros sobre o número de Diptera com ou sem cobertura contra da chuva, utilizando a metodologia de coleta pitfall, 19 de março e 18 de junho de 2012, PR, Curitiba, Brasil

Pitfall		Tratamentos								p-valor
		Sem cobertura contra chuva				Com cobertura contra chuva				
		Controle		Moxidectina		Controle		Moxidectina		
Insecta	Diptera	M _e	\bar{X}	M _e	\bar{X}	M _e	\bar{X}	M _e	\bar{X}	
	Sphaeroceridae	3	3	7	6	5	5	5	5	0,6427
	Muscidae	1	1	1	2	1	1	1	2	0,8576
	Sarcophagidae	1	1	1	2	0	0	1	1	0,7603
	Dolichopodidae	0	0	0	0	0	0	1	1	0,0719
	Bibionidae	1	1	0	0	0	0	0	0	0,1436
	Chloropidae	0	1	2	1	2	2	1	1	0,7862
	Sciaridae	0	0	1	1	1	1	1	1	0,4290
	Cecidomyiidae	0	0	0	0	0	1	1	1	0,7189
	Ulidiidae	0	0	0	0	0	0	1	1	0,1129

p-valor pelo teste de Kruskal-Wallis

TABELA 6 – Efeito da moxidectina nas fezes de carneiros sobre o número de Hymenoptera com ou sem a presença da chuva, utilizando a metodologia de coleta pitfall ou contagem direta, 19 de março e 18 de junho de 2012, PR, Curitiba, Brasil

Pitfall		Tratamentos								<i>p</i> -valor
		Sem cobertura contra chuva				Com cobertura contra a chuva				
		Controle		Moxidectina		Controle		Moxidectina		
Hymenoptera	Formicidae	M_e	\bar{X}	M_e	\bar{X}	M_e	\bar{X}	M_e	\bar{X}	
	Pheidole sp.	6	8	4	7	7	9	9	10	0,411
	Dorymyrmex sp.	1	1	3	6	3	4	4	5	0,057
	Camponotus sp.	0	0	0	1	0	1	1	1	0,725
	Linepithema sp.	0	1	1	2	1	2	2	2	0,792
	Acromyrmex sp.	0	1	2	3	2	2	2	2	0,273
	Pachycondyla sp.	2	2	1	1	1	1	1	1	0,477
	Brachymyrmex sp.	0	1	0	1	1	1	1	1	0,765
	Outros	2	2	3	4	3	3	3	3	0,438
Contagem direta		M_e	\bar{X}	M_e	\bar{X}	M_e	\bar{X}	M_e	\bar{X}	<i>p</i> -valor
Hymenoptera	Formicidae									
	Pheidole sp.	1	1	1	5	1	4	1	8	0,7864
	Acromyrmex sp.	3	3	3	3	3	5	3	3	0,3412
	Solenopsis saevissima	0	3	0	0	0	0	0	1	0,5138
	Hipoponera sp.	0	0	1	1	1	2	1	1	0,1027
Isoptera	Termitidae	0	0	0	0	0	0	0	2	0,5724

**p*-valor significativo ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis

TABELA 7 - Efeito da moxidectina nas fezes de carneiros sobre o número de Coleoptera, com ou sem cobertura contra a chuva, utilizando a metodologia de coleta pitfall ou contagem direta, 19 de março e 18 de junho de 2012, PR, Curitiba, Brasil

Pitfall e Contagem direta		Tratamentos								p-valor	
		Sem cobertura contra a chuva				Com cobertura contra a chuva					
		Controle		Moxidectina		Controle		Moxidectina			
Insecta	Coleoptera	M _e	\bar{X}	M _e	\bar{X}	M _e	\bar{X}	M _e	\bar{X}		
	Scarabaeidae	Ataenius sp.	3	2	0	0	1	1	0	0	0,1945
	Aphodiidae	Labarrus pseudolividas	1	1	0	0	0	0	0	0	0,0547

p-valor (P<0,05) pelo teste de Kruskal-Wallis

3.3.2 Decomposição das fezes

O peso seco (g), as porcentagens de N e C foram afetados pelos tratamentos ($P < 0.05$) e pelos períodos ($P < 0.01$), entretanto não houve interação entre tratamentos e períodos ($P > 0.05$) (Tabela 8).

A cobertura contra a chuva diminuiu ($P < 0.05$) a decomposição dos bolos fecais, visto que o peso seco dos bolos fecais foi superior para este tratamento em comparação ao sem cobertura. Entretanto, as porcentagens de C e N não diferiram para este fator. A moxidectina aumentou a decomposição dos bolos fecais e a %N, ao passo que proporcionou efeito contrário à %C (Tabela 8).

Em relação ao efeito de período, a decomposição apresentou grande variação ao longo do tempo. Nos primeiros dias, o peso seco das fezes apresentou uma diminuição acentuada, média de 1,95 g de fezes secas por dia; de 31 de março a 18 de maio, a redução do peso seco das fezes foi de apenas 0,16 g de fezes secas por dia. No último mês, a taxa de decomposição aumentou cuja perda diária foi de 0,25 g de fezes secas por dia (Figura 10).

A porcentagem de N, também, apresentou grande variação, ao longo do tempo (Figura 11). Nos primeiros dias de exposição ao ambiente, entre 23 a 27 de março, houve queda na %N. Após este período até 21 de abril, a concentração permaneceu constante (1,5%). Nos dois últimos meses de experimento, houve aumento até 1,63% de N. A % de C não apresentou efeito de regressão polinomial, ao longo do tempo (Figura 12).

TABELA 8 - Nitrogênio (%), carbono (%) e peso seco das fezes (g) de bolos fecais de carneiros que não foram desverminados, Controle, e desverminados com Moxidectina (Cydectin®), com ou sem cobertura contra a chuva.

Item	Tratamentos				P-valor			Contrastes, P ⁴		
	Sem cobertura contra chuva		Com cobertura contra chuva		T ¹	P ²	T*P ³	1	2	3
	Controle	Moxidectina	Controle	Moxidectina						
Nitrogênio, %	1,46	1,71	1,49	1,69	<0,01	<0,01	0,052	0,367	0,824	<0,01
Carbono, %	37,64	36,86	37,75	37,28	<0,05	<0,01	0,920	0,608	0,075	<0,01
Relação C:N	25,78	21,55	25,34	22,06	<0,01	<0,01	0,128	0,408	0,965	<0,01
Peso seco das fezes, g	48,24	34,45	52,46	38,73	<0,01	<0,01	0,144	<0,01	<0,01	<0,01

¹T: Efeito de tratamentos.

²P: Efeito de períodos.

³T*P: Efeitos de interação entre tratamentos e períodos.

⁴Contraste: 1 – entre controle com ou sem cobertura contra a chuva, 2 – entre moxidectina com ou sem cobertura contra a chuva, 3 – entre controle e moxidectina.

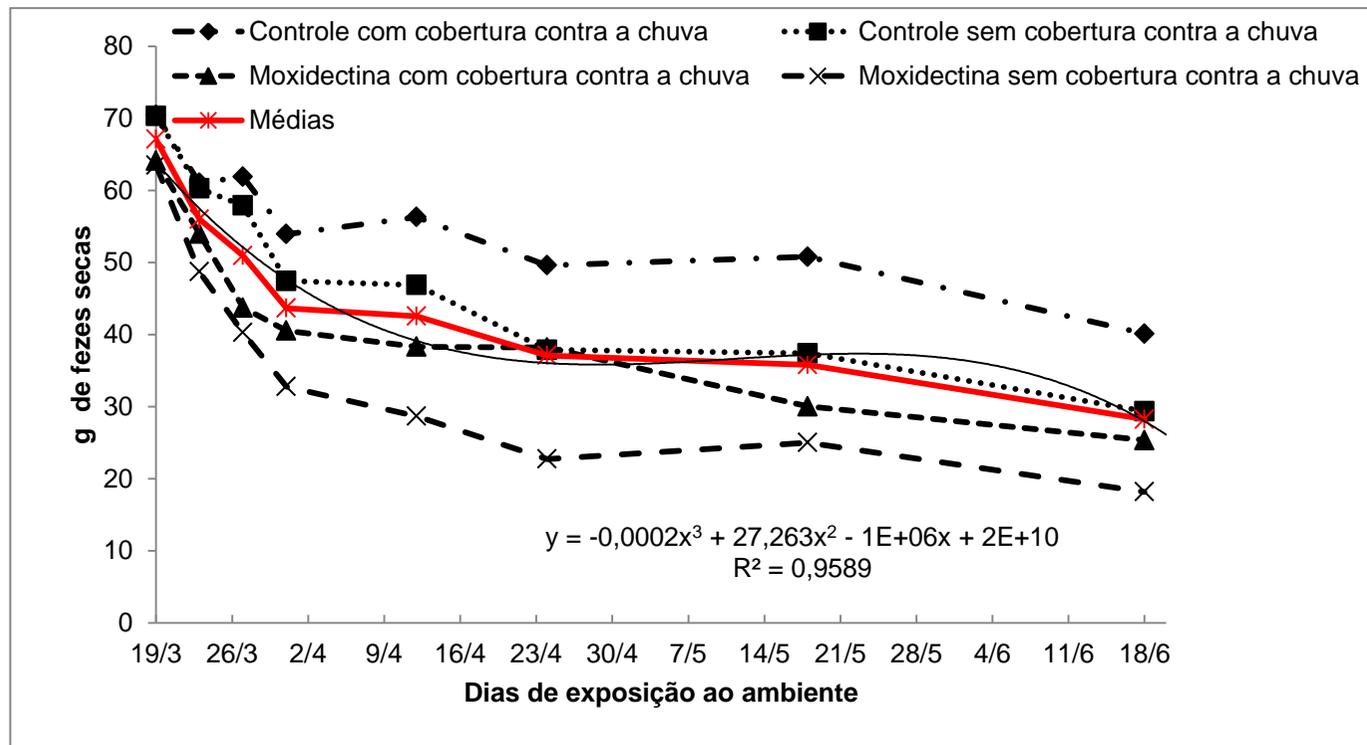


FIGURA 10 – Decomposição de bolos fecais de 200g de carneiros desverminados com moxidectina (Cydectin®) ou não, com ou sem cobertura contra a chuva, de 19 de março a 18 de junho de 2012, Curitiba, PR, Brasil.

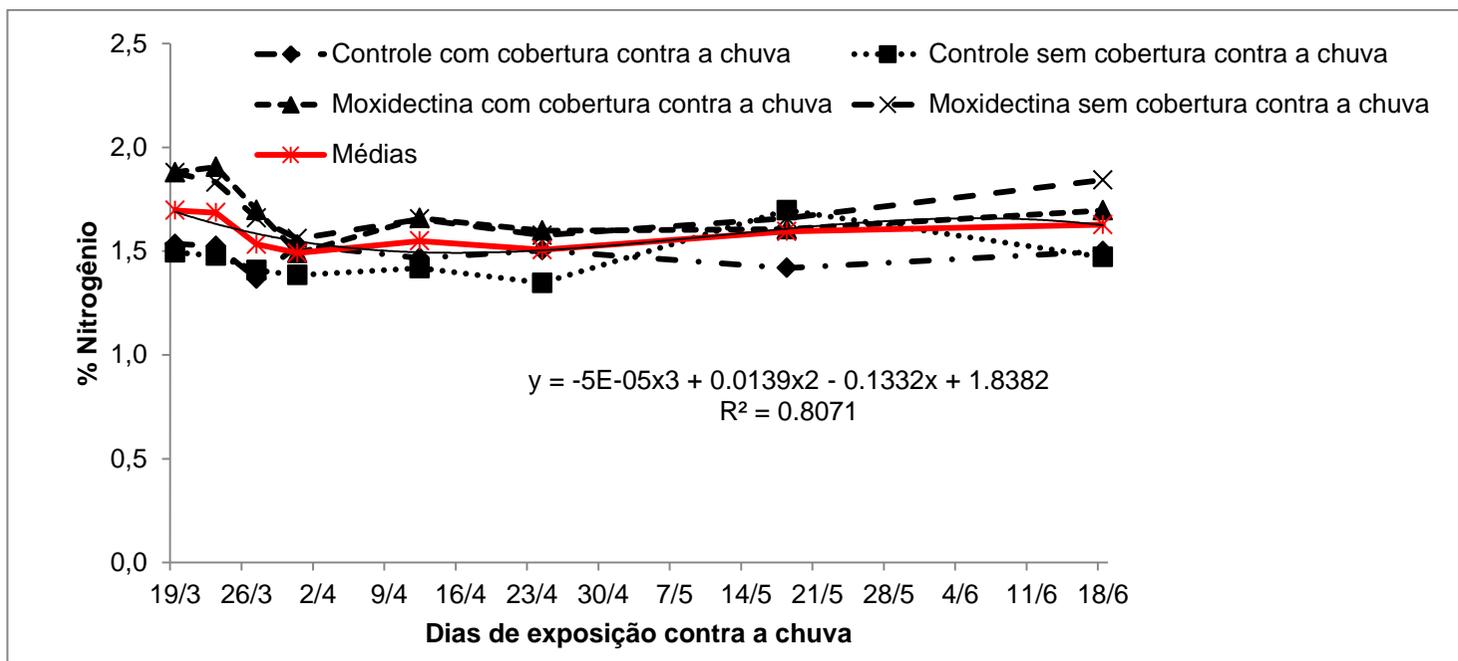


FIGURA 11 - Porcentagens de nitrogênio de bolos fecais de 200g de carneiros desverminados com moxidectina (Cydectin®) ou não, com ou sem cobertura contra a chuva, de 19 de março a 18 de junho de 2012, Curitiba, PR, Brasil.

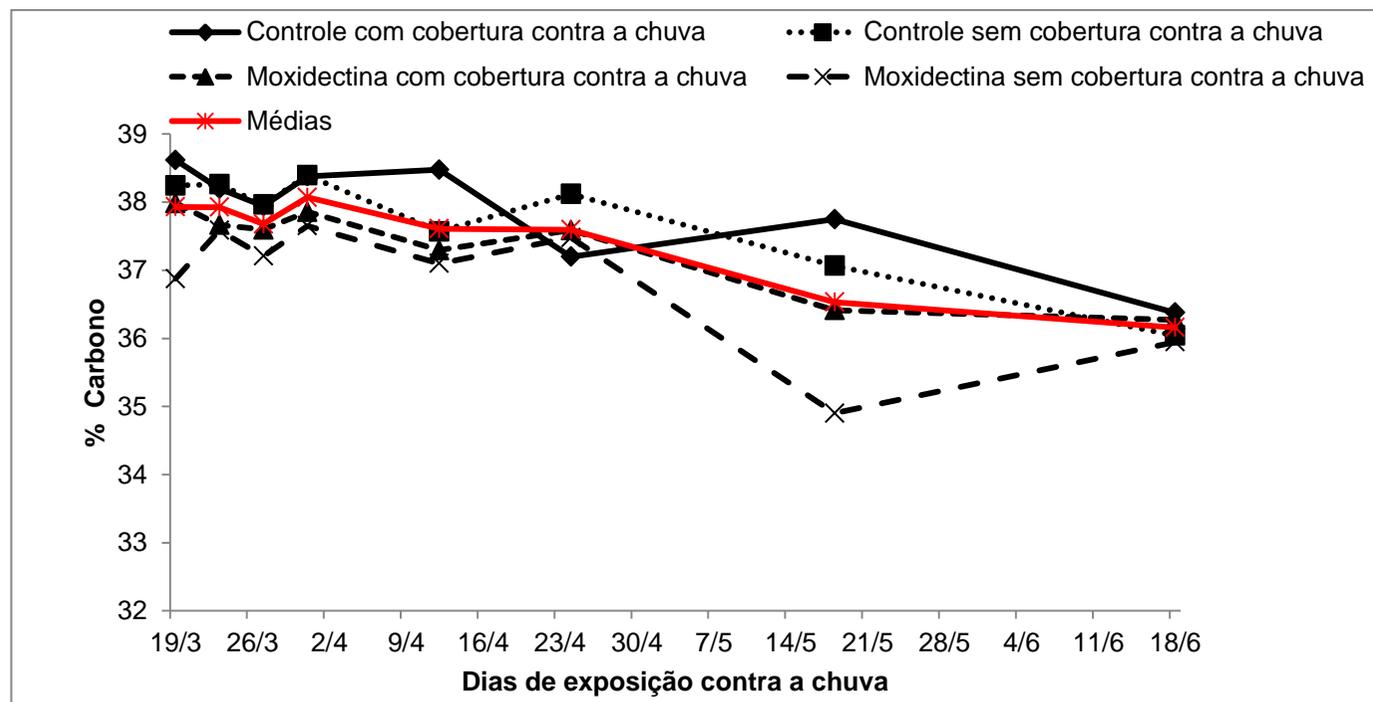


FIGURA 12 - Porcentagens de carbono de bolos fecais de 200g de carneiros desverminados com moxidectina (Cydectin®) ou não, com ou sem cobertura contra a chuva, de 19 de março a 18 de junho de 2012, Curitiba, PR, Brasil.

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Fauna coprófaga

O número de indivíduos total e por família coletados neste experimento foi menor que o observado por outros autores como IWASA et al., (2008). Esses autores observaram a presença de 5100 moscas coletadas durante uma semana de 48 bolos fecais de bovinos com 700 g/ cada. Esta diferença pode estar relacionada com as características entre as fezes de ovinos e caprinos. A umidade entre as fezes destas espécies constitui um dos fatores a ser considerado, sendo de $16,45\% \pm 0,95\%$ (SAUNDERS et al., 2006), para as fezes de bovinos e $33,53\% \pm 1,77\%$ para a de ovinos. FICHER et al. (1970) demonstraram que entre os animais domésticos, as fezes de ovinos possuem menos odor e são menos atrativas aos besouros. Além disso, as fezes de bovinos possuem um volume maior e rapidamente forma-se uma película que evita mais dessecação. Isso prolonga a atividade dos invertebrados coprófagos (BEYNON, 2012). Por outro lado, as fezes de ovinos são mais susceptíveis à dessecação e podem ser atrativas num período menor de tempo que as de bovinos (SOWIG & WASSMER, 1994).

Os insetos são atraídos pelas fezes por fatores físicos como odor, cor e forma. MOHR (1943) encontrou 36 gêneros de 17 famílias de Diptera em fezes frescas. As principais famílias foram *Sepsidae*, *Sphaeroceridae*, *Muscidae*, *Sarcophagidae*, *Stratiomyidae* and *Anthomyidae*. As fezes frescas são colonizadas quase imediatamente pelos dípteros adultos os quais se alimentam, se reproduzem e ovopositam, produzindo nova geração a cada 2 a 3 semanas. O número de dípteros declina-se rapidamente após poucas horas, devido à redução do odor (FLOATE, 2006). Entretanto, nesta pesquisa, o número de dípteros decresceu após o décimo dia. Verificou-se que nesse período, a chuva pode ter favorecido a atratividade, visto que o número de indivíduos aumentou logo após este fenômeno. Em geral, a colonização do bolo fecal é influenciada por uma sucessão de eventos relacionada com a temperatura e umidade, e o efeito de tais parâmetros na

velocidade de dessecação (LAURENCE, 1954). A atividade dos insetos tende a ser maior em ambientes quentes e/ou úmidos (FLOATE et al., 2005).

Não foi verificada a presença de larvas de dípteros, o que pode explicar o número reduzido de coleópteros coletados. Pesquisas descrevem que os dípteros ovopositam, logo, nas primeiras semanas de exposição das fezes ao ambiente. Os coleópteros predadores são atraídos para se alimentarem de insetos imaturos em desenvolvimento. Em contraste com as moscas, o tempo de desenvolvimento de ovo-para-adulto, em coleópteros, leva muitas vezes semanas ou meses (FLOATE, 2006).

Noventa % da colonização dos coleópteros aconteceu após três semanas de exposição e 75% dos dípteros da família Sphaeroceridea foi aos primeiros 10 dias. FLOATE (2006) verificou menor colonização de insetos após duas a três semanas de exposição.

A moxidectina não apresentou efeito tóxico aos insetos. Os efeitos da ivermectina e da moxidectina aos insetos foram reportados por STRONG & WALL (1994). Esses encontraram número reduzido de coleópteros adultos, *Aphodius* e *Scarabaeidae*, resultado semelhante aos verificados neste artigo.

A moxidectina apresenta poucas diferenças em sua estrutura química em relação à ivermectina, sendo a primeira molécula mais instável ambientalmente, e pode aparecer alguns efeitos contra a fauna coprófaga (PÉREZ et al., 2001), considerada menos tóxica para coleópteros coprófagos em fezes de bovinos (LUMARET et al., 2012; ÔMURA, 2002). Este estudo revelou mesma resposta para as fezes de ovinos. Entretanto, no trabalho de FLOATE *et al.*(2002), reduções foram observadas na população de Coleoptera duas semanas após a aplicação tópica da moxidectina. BLACK et al. (2007), também, concluíram que a moxidectina pode ser tóxica no primeiro dia de administração.

O número de dípteros recuperados (SUÁREZ et al., 2009) nas fezes expostas ao ambiente de animais que receberam moxidectina via *pour-on* ou por aplicação subcutânea foi menor do que o controle, nos dias 3, 11 de pós-tratamento e até 21 dias de exposição. Esses pesquisadores não verificaram a diferença no número de adultos coleópteros entre controles e bolos fecais tratados.

A via de administração influencia no efeito contra a fauna coprófaga. Para os primeiros dias, a aplicação via *pour-on* mostrou-se proporcionar maior efeito

negativo contra larvas de Coleoptera após 3 dias de administração em comparação à aplicação subcutânea. Entretanto, após este período, o tratamento via *pour-on* tornou-se menos prejudicial (SUÁREZ et al., 2009). Esses resultados, demonstram o efeito da lambertura no padrão de eliminação fecal de MXD descrito para os animais tratados com formulações via *pour-on* (LAFFONT et al , 2001; SALLOVITZ et al , 2003).

Os fármacos podem afetar determinadas espécies, incluindo predadores e parasitoides da fauna coprófaga, o que provavelmente favoreça a sua ação, aumentando a degradação dos bolos fecais (FLOATE et al., 2005).

Outro fator, além da via de excreção e especificidade de ação, que pode influenciar no efeito dos fármacos sobre a fauna coprófaga, são as condições climáticas e as estações do ano. Taxas de lotação baixas e períodos de frio extremo ou de tempo quente e seco geralmente mantêm infecções de endoparasitas em bovinos em pastagens em níveis subclínicos. Nas diferentes épocas do ano, no Canadá, esses fármacos são aplicados na maioria das vezes, no outono, quando os bovinos são transferidos das pastagens para o confinamento. Aplicação neste momento atinge ambos os parasitas externos e internos que acometem bovinos confinados durante os meses de inverno. Aplicação na primavera de endectocidas, no Canadá, em bovinos é menos comum (REW & VERCRUYSSSE, 2002). Desta forma, há menor exposição do fármaco ao ambiente e conseqüentemente, à fauna coprófaga. Uma pesquisa realizada na Inglaterra identificou-se que 80% dos produtores de leite estavam usando anti-helmínticos em animais jovens 2 a 4 vezes por ano (STAFFORD & COLES, 1999); esquema semelhante, normalmente, ao observado no Brasil (MOLENTO, 2005). Assim, ao conhecer o período de toxicidade dos fármacos nas fezes expostas ao ambiente, podem-se estabelecer esquemas de manejo que reduza o contato destas fezes à fauna coprófaga, nos períodos de toxicidade.

3.4.2 Decomposição dos bolos fecais

A degradação dos bolos fecais foi mais acentuada para o tratamento com a presença do fármaco em comparação ao controle, evidenciando o pouco poder repelente e tóxico desta molécula. FLOATE (2006) descreve que os bolos fecais de animais tratados podem degradar de forma semelhante, degradam-se mais lentamente, ou degradam-se mais rapidamente do que os bolos fecais de animais não tratados. Há muitos fatores que contribuem com este processo. Estes incluem fatores ambientais (por exemplo, chuva, luz solar, temperatura), propriedades físicas das fezes (muitas vezes devido à dieta dos animais), a atividade dos artrópodes nas fezes e no solo e, a carga parasitária dos animais (KOLAR & ERŽEN, 2007; PEREZ et al ., 2010).

Sugere-se que os bolos fecais com moxidectina, provavelmente, atraíram a fauna coprófaga. Apesar do número total de indivíduos coletados não tenha diferido entre as fezes de animais tratados e não tratados com moxidectina, houve 36% mais indivíduos nos tratamentos com a presença do fármaco, o que pode ter aumentado a degradação do bolo fecal. Coleópteros foram mais atraídos pelas fezes que continham resíduos de ivermectina (~ 61%) em relação ao controle (~ 39%), e também foram mais atraídos pelas fezes de ovinos que continham esse mesmo fármaco (~ 54%) em relação ao controle (~ 46%) (WARDHAUGH & MAHON, 1991).

A degradação biológica contribui com o processo de decomposição das fezes, sendo realizada pela biota tais como fungos, bactérias, artrópodes e minhocas. Assim, as fezes é um substrato adequado para promover a colonização e mineralização subsequente e atividade microbiana, nesse sentido, salienta a importância, especialmente a relação C: N (HAYNES & WILLIAMS, 1993).

A porcentagem de N dos bolos fecais de animais desverminados foi maior em comparação ao controle, pode ser um dos motivos que justifiquem a maior atratividade da fauna pelos bolos fecais de animais desverminados com moxidectina. Desta forma, sugere-se que a composição das fezes após a aplicação de moxidectina pode ser modificada. Considerando-se que o peso de 1000 parasitas é cerca de 92 g (ALLONBY & URQUHART, 1975), ao desverminar os animais, a maior parte da carga parasitária pode ser eliminada nas fezes. Além disso, a logo

após a aplicação do fármaco, com a liberação dos helmintos hematófagos, proporcionando hemorragias na região da mucosa, onde os parasitas estavam aderidos, aumentando o teor de N nas fezes.

A principal espécie de endoparasitas de ovinos no Brasil é o *Haemonchus contortus*, possuindo alta prevalência, associada à grande patogenicidade. Este parasita se alimenta de sangue do abomaso durante toda a sua vida parasitária (AMARANTE & SALES, 2007). Assim, o animal hospedeiro, sem controle parasitário, pode apresentar perda de peso e anemia, o que pode refletir num quadro de hipoproteïnemia e hipoalbumemia (MELO, 2005), conseqüentemente, haverá uma menor percentagem de nitrogênio sendo eliminado nas fezes, o que pode ter ocorrido com os animais do tratamento controle.

A chuva, também, contribuiu com a degradação e a liberação de nutrientes das placas de fezes pela quebra física causada principalmente pelo impacto das gotas.

3.5 CONCLUSÃO

A moxidectina presente nas fezes não proporcionou efeito tóxico sobre as ordens Diptera, Hymenoptera e Coleoptera coprófaga, até 88 dias, em condição subtropical. Adicionalmente, a moxidectina presente no bolo fecal aumentou a decomposição dos bolos fecais; assim, as fezes com moxidectina promoveu a atratividade da fauna, por apresentar em sua constituição química maior percentagem de nitrogênio.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, J.R. Recent developments in the control of some arthropods of public health and veterinary importance. **Bulletin of Entomology Society American**, v. 12, p. 342–348, 1966.

BEYNON, S.A. Potential environmental consequences of administration of anthelmintics to sheep, **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 113- 124, 2012.

BLACK, T.; LEWIS, E.T.; BECKETT, J.L.; CLYMER, B.C. Impact of equine anthelmintics on dung beetle reproduction. Proceedings, Western Section, **American Society of Animal Science**, v. 58, p. 131-133, 2007.

CAMPBELL W.C. Ivermectin and abamectin. Springer, New York. ISBN 0-387-96944-6. 1989.

DOHERTY, W.M., STEWART, N.P., COBB, R.M., KEIRAN, P.J. In vitro comparison of the larvicidal activity of moxidectin and abamectin against *Onthophagus gazella* (F.) (Coleoptera: Scarabaeidae) and *Haematobia irritans exigua* De Meijere (Diptera: Muscidae). **Journal Australian of Entomology Society**, v. 33, p. 71–74, 1994.

FINCHER, G.T.; STEWART, T.B.; DAVIS, R. Attraction of coprophagous beetles to feces of various animals. **The Journal of Parasitology**, v. 56, p. 378–383, 1970.

FINCHER, G.T.; WANG, G.T. Injectable moxidectin for cattle: effects on two species of dung burying beetles. **Southwestern Entomology**, v. 17, p. 303–306, 1992.

FLOATE, K.D.; WARDHAUGH, K.G.; BOXALL, A.B.A.; SHERRATT, T.N. Fecal Residues of Veterinary Parasiticides: Nontarget effects in the pasture environment. **Annual Reviews Entomology**, v. 50, p. 153- 179, 2005.

FLOATE, K.D.; SPOONER, R., COLWELLI, D. Larvicidal activity of endectocides against pest flies in the dung of treated cattle. **Medicine Veterinary Entomology**. v. 15, p. 117–120, 2001.

FLOATE, K.D.; COLWELL, D.D.; FOX, A.S. Reductions on non-pest insects in dung of cattle treated with endectocides: a comparison of four products. **Bulletin of Entomology Research**. v. 92, p. 471–481, 2002.

FLOATE, K.D. Endectocide use in cattle and fecal residues: environmental effects in Canada residues affect insect attraction to dung from treated cattle: implications for toxicity tests. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 70, p. 1-10, 2006.

HAYNES, R.J.; WILLIAMS, P.H. Nutrient cycling and fertility in the grazed pasture ecosystem. **Advances in Agronomy**, v. 49, p. 119-199, 1993.

HERD, R. Endectocidal drugs: Ecological risks and counter-measures. **International Journal of Parasitology**, v. 25, n. 8, p. 875–885, 1995.

IWASA, M.; SUZUKI, N.; MARUYAMA, M. Effects of moxidectin on coprophagous insects in cattle dung pats in Japan. **Applied Entomology and Zoology**, v. 43, p. 271-280, 2008.

KOLAR, L.; ERZEN, N.K.. Degradation of abamectin and doramectin in sheep faeces under different experimental conditions. **Internacional Journal of Environment Pollution**, v. 31, p. 22–33, 2007.

LAFFONT, C.M.; ALVINERIE, M.; BOUSQUET-MELOU, A.; TOUTAIN, P.L. Licking behaviour and environmental contamination arising from pour-on ivermectin for cattle. **Internacional Journal of Parasitology**, v. 31, p. 1687–1692, 2001.

LANUSSE, C.; LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; ALVAREZ, L.; SÁNCHEZ, S.; SUTRA, J.F.; GALTIER, P.; ALVINERIE, M. Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 20, p. 91-99, 1997.

LAURENCE, B.R. The larval inhabitants of cow pats. **Journal of Animal Ecology**, v. 23, p. 234–260, 1954.

LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; SALLOVITZ, J.; IMPERIALE F.; PIS, A.; LANUSSE, C. Loperamide-induced enhancement of moxidectin availability in cattle. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 25 p. 111–120, 2002.

LUMARET, J.P.; ERROUISSI, F. Use of anthelmintics in herbivores and evaluation of risks for the non-target fauna of pastures. **Veterinary Research**. v. 33, p. 547–562, 2002.

LUMARET, J.P.; ERROUISSI, F.; FLOATE, K.; RÖMBKE, J. WARDHAUGH, K. A Review on the Toxicity and Non-Target Effects of Macrocyclic Lactones in Terrestrial

and Aquatic Environments, **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, p. 1004-1060, 2012.

MCKELLAR, Q. A.; BENCHAOUI, H.A. Avermectins and Milbemycins. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 19, p. 331-351, 1996.

MOHR, C.O. Cattle droppings as ecological units. **Ecological Monographs**, v. 131, p. 275–298, 1943.

MOLENTO, M.B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, supl.1, p. 82-87, 2004.

MOLENTO, M.F. Método Famacha tratamento seletivo no controle do *Haemonchus contortus*. In: **Simpósio sobre Controle de Parasitas em Pequenos Ruminantes**. FEINCO/SP, 2005.

MULROY, A. Monitoring and Analysis of Water and Wastes. **Water Environment Technology**, v. 13, p. 32-36, 2001.

NJUE, A.I.; HAYASHI, J.; KINNE, L.; FENG, X.P.; PRICHARD, R.K. Mutations in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel alpha3 and beta subunits from ivermectin-resistant *Cooperia oncophora* affect agonist sensitivity. **Journal of Neurochemistry**, v. 89, p. 1137–1147, 2004.

ÕMURA, S. Macrolide Antibiotics – Chemistry, Biology and Practice 2nd edn (ed. Omura, S.), Academic Press, p. 571-576, 2002.

PÉREZ, R.; CABEZAS, I. SUTRA, J.F., GALTIER, P.; ALVINERIE, M. Fecal excretion profile of moxidectin and ivermectin after oral administration in horses. **The Veterinary Journal**, v. 161, p. 85-92, 2001.

PEREZ, R.; PALMA, C.; CABEZAS, I.; RUBILAR, L.; ARBOIX, M. The influence of gastrointestinal parasitism on fecal elimination of doramectin, in lambs. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 2017–2021, 2010.

REW, R.; VERCRUYSSSE, J. Use of macrocyclic lactones to control cattle parasites in the USA and Canada. In: VERCRUYSSSE, J.; REW, R.S.; eds. **Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy**. Wallingford, England: CABI Publishing, p. 248 – 261, 2002.

SALLOVITZ, J.M.; LIFSCHITZ, A.; IMPERIALE, F.; VIRKEL, G.; LANUSSE, C.E. A detailed assessment of the pattern of moxidectin tissue distribution after pour-on treatment in calves. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 397–404, 2003.

SANHUEZA, C.E.N. Comparación del perfil de excreción fecal de moxidectina luego de la administración subcutánea em ovinos com y sin parasitismo gastrointestinal. Memoria de titulo de Medico Veterinario, **Universidad de Concepción, Facultad de Medicina Veterinaria**, Chile, 50p, 2006.

SAUNDERS, C.; BARBER, A.; TAYLOR, G. Food Miles – Comparative Energy/Emissions Performance of New Zealand’s Agriculture Industry. AERU Research Report No. 285, Lincoln University, Canterbury, NZ, July 2006.

SOWIG, P.; WASSMER, T. Resource partitioning in coprophagous beetles from sheep dung: phenology and microhabitat preference. **Zoologische Jahrbuecher Systematik**, v. 121, p. 171-192, 1994.

STAFFORD, K.; COLES, G.C. Nematode control practices and anthelmintic resistance in dairy calves in the south west of England. **Veterinary Research**, v. 144, p. 659–661, 1999.

STRONG, L.; WALL, R. Effects of ivermectin and moxidectin on the insects of cattle dung. **Bulletin. of Entomology Research**, v. 84, p. 403–409, 1994.

SUÁREZ, V.H.; LIFSCHITZ, A.; SALLOVITZ, J.M., LANUSSE, C.E. Effects of ivermectin and doramectin faecal residues on the invertebrate colonization of cattle dung. **Journal Applied of Entomology**, v. 127, p. 481–488, 2003.

SUÁREZ, V.H. Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. **Veterinary Research**, v. 33, p. 563–573, 2002.

SUÁREZ, V.H.; LIFSCHITZ, A.L.; SALLOVITZ, J.M.; LANUSSE, C.E. Effects of faecal residues of moxidectin and doramectin on the activity of arthropods in cattle dung, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1551-1558, 2009.

TAKIGUCHI, Y.; MISHIMA, H.; OKUDA, M.; TERAOKA, M. Mylbemycins, a new family of macrolide antibiotics: fermentation, isolation and physico-chemical properties. **Journal of Antibiotics**, v. 33, p. 1120-1127, 1980.

WARDHAUGH, K.G.; MAHON, R.J. Avermectin residues in sheep and cattle dung and their effects on dung beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) colonization and dung burial. **Bulletin of Entomology Research**, v. 81, p. 333–339, 1991.

WARDHAUGH, K.; HOLTER, P. WHITBY, W.; SHELLEY, K. Effects of drug residues in the faeces of cattle treated with injectable formulations of ivermectin an moxidectin on larvae of the bush fly, *Musca Vetustissima* and the house fly, *Musca domestica*. **Australian Veterinary Journal**. v.74, p. 370-374, 1996.

4. IMPACTO DO RESÍDUO DE MOXIDECTINA PRESENTE NAS FEZES DE OVINOS UTILIZADAS COMO ADUBO ORGÂNICO SOBRE A MICROBIOLOGIA DO SOLO E O CRESCIMENTO DO SORGO (*Sorghum vulgare Pers.*)

RESUMO

O material orgânico proveniente de dejetos de animais podem conter resíduos de substâncias químicas que podem ocasionar alterações qualitativas na população microbiana do solo e na sua atividade, interferindo no crescimento das plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto na microbiologia do solo do resíduo de moxidectina presente nas fezes de ovinos. Foram utilizados 36 vasos de polietileno com 22,5 cm de diâmetro e altura, em casa de vegetação, contendo em média $3176,84 \pm 97,72$ g de solo seco e 80 g de fezes secas, em delineamento inteiramente casualizado, contaminadas em laboratório com níveis crescentes (0, 75, 300, 600, 1500 e 3000 ng.g^{-1} de fezes secas) de moxidectina. Foram realizadas amostragens semanais de solo + fezes (0, 7, 14, 21 e 28 dias) para a contagem de bactérias, fungos e actinobactérias por meio de diluições sucessivas em placas de Petri. Adicionalmente, aos 56 dias foi realizada mais uma amostragem para a determinação da biomassa microbiana (BMS) pela respiração induzida pelo substrato e respiração microbianas em sistema estático. Aos 56 dias determinaram-se os teores de amônio e nitrato no solo e, o peso dos vasos foi uniformizado em 2,00 kg e semeado o sorgo granífero (*Sorghum vulgare Pers.*). Foram semeadas 5 sementes para avaliação da emergência e três plantas foram selecionadas para avaliações semanais do crescimento, por meio da altura, até os 28 dias. Ao atingir em média 30 cm, separou-se a parte aérea da raiz para mensuração do peso seco (g) e da área (cm^2). A densidade populacional de micro-organismos do solo não foi afetada pelos níveis crescentes de moxidectina. Entretanto, o resíduo proporcionou redução linear na respiração microbiana e na biomassa microbiana. O processo de amonificação não foi afetado pela presença de moxidectina, contudo a produção de nitrato foi reduzida a 50%, independente do nível utilizado. O resíduo de moxidectina presente nas fezes de ovinos proporcionou impacto negativo à atividade microbiana do solo e na biomassa microbiana, entretanto, este efeito não repercutiu no crescimento da planta, visto que a redução no peso da raiz foi verificada, apenas, em concentrações elevadas (3000 ng.g^{-1}).

Palavras chave: actinobactérias, anti-helmíntico, bactérias, fungos, toxicidade, altura.

IMPACT ON SOIL MICROBIOLOGY AND SORGHUM GROWTH OF SOIL FERTILIZED WITH SHEEP FECES CONTAINING MOXIDECTIN RESIDUE

ABSTRACT

The organic material from animal waste often contains residues of chemicals that can cause quantitative and qualitative changes in soil microbial population and its activity. This study aimed to assess the impact on soil microbiology of moxidectin residues present in the faeces of sheep. The study included 36 polyethylene pots in a greenhouse, containing on average 3176.84 ± 97.72 g of dry soil, with 80 g of dry faeces, contaminated in the laboratory with increasing levels (0, 75, 300, 600, 1500 and 3000 ng / g dry faeces) of moxidectin. The pot soil moisture + faeces was adjusted to field capacity of 40%, and the pots were weighed daily and added to water to maintain the initial moisture. The soil was collected weekly (0, 7, 14, 21, 28 and 63 days) for counting bacteria, fungi and actinomycetes in successive dilutions in Petri dishes, biomass and microbial respiration. In the 56th day the concentrations of ammonium and nitrate in the soil has been determined. On the same date, pots weight was uniformized in 2kg, and sown five seeds of sorghum (*Sorghum vulgare* Pers.). The number of emerged plants was quantified and three plants were selected for growth assessments weekly through height for 28 days. In the last experimental day, separated the shoot from the root to measure the dry weight (g) and area (cm²) of each one. The population density of micro-organisms in the soil was not affected by increasing levels of moxidectin. However, the residue provided linear reduction in microbial activity (respiration and biomass). The ammonification process were not affected by the presence of moxidectin, however, nitrate production was reduced by half, regardless of the level used. Moxidectin residue in sheep feces yielded negative impact on soil microbial activity, which can interfere with nutrient cycling and other interactions between soil, plant and animal. The root weight of treated pot with moxidectin was lower than the control.

Key words: anthelmintic, actinomycetes, bacteria, fungus, height, toxicity.

4.1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura de corte no país vem demonstrando ser atividade com oportunidades reais para os produtores brasileiros, principalmente em pastagens, visto que a demanda do produto é ainda superior à oferta. Este fato é confirmado pelo aumento das importações de carne, em 2012, atingindo 6,52 mil toneladas com um valor de US\$ 36,1 milhões de dólares (MDIC, 2013).

A produção de ovinos em pastagens tropicais pode ser uma alternativa rentável, entretanto o manejo inadequado, por meio do intervalo de pastejo reduzido e da alta taxa de lotação tem contribuído para o incremento das infecções de nematódeos nas pastagens (NOGUEIRA et al., 2011).

A falta de conhecimento mais profundo sobre métodos mais eficientes de controle de parasitas faz com que sejam realizados esquemas de desverminações excessivas ou inadequadas cujos intervalos variam de 15 a 30 dias, e muitas vezes com alternâncias de princípios ativos (FERNANDES et al., 2010), excedendo o uso de anti-helmínticos.

Os anti-helmínticos são manipulados para serem persistentes, podendo proporcionar uma excreção prolongada nas fezes, visto que esta é a principal via de eliminação (50 a 90%) (MULROY, 2001) e, portanto, podem ser considerados eventuais contaminantes do solo.

A matéria orgânica proveniente dos dejetos dos animais afeta diretamente as características biológicas do solo, teor de carbono, energia e nutrientes para os organismos quimioheterotróficos. Estes realizam a mineralização, transformam compostos orgânicos em componentes inorgânicos (H_2 , NH_4 , H_2S , CO_2) os quais são oxidados (H_2O , NO_3^- , $SO_4^{=}$) pelos micro-organismos quimioautotrófos (ABELLO, 2012).

A contribuição dos animais por um período maior de tempo, principalmente herbívoros que usufruem do ambiente de pastagem, na adição de matéria orgânica pelos bolos fecais ou pela utilização do esterco como adubação orgânica é considerável. Cerca de 70 a 95% dos nutrientes ingeridos podem retornar à pastagem pelas excreções (RUSSELLE, 2007). Um bovino adulto defeca 11 a 16 vezes por dia. Em cada evento produz 1,5 a 2,7 kg de fezes frescas (MATHEWS &

SOLLENBERGER, 1996), enquanto que para um ovino adulto a excreção de fezes diária é de 350 g em peso seco (WHITEHEAD, 1970). Entre os macronutrientes, o fósforo, o cálcio e o magnésio são excretados principalmente nas fezes; o nitrogênio e o enxofre podem ser excretados em significantes proporções tanto nas fezes como na urina; e o potássio é excretado em maior quantidade na urina (HAYNES & WILLIAMS, 1993). O retorno diário de nutrientes pelas fezes, por animal, foi estimado em 22,10 g de nitrogênio, 10,06 g de fósforo, 6,12 g de potássio, 21,70 g de cálcio e 9,47 g de magnésio para novilhas com peso médio inicial de 300 kg em pastagem de *Brachiaria decumbens* na Zona da Mata de Minas Gerais (BRAZ et al., 2002).

Altas concentrações de resíduos de fármacos veterinários nos dejetos de animais podem causar mudanças quantitativas e qualitativas na população microbiana do solo, bem como em sua atividade. Os atributos microbiológicos biomassa microbiana e respiração basal podem servir como indicadores do impacto ambiental destas substâncias.

A biomassa microbiana é definida como a parte viva da matéria orgânica do solo incluindo bactérias, fungos, actinobactérias, algas e microfauna, excluindo-se as raízes e os animais maiores que $5 \times 10 \mu\text{m}^3$, sendo considerada o compartimento central do ciclo do C (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Esse reservatório contém em média 2 a 5 % do C orgânico do solo (JENKINSON & LADD, 1981) e 1 a 5% do N total do solo (SMITH & PAUL, 1990).

A biomassa microbiana e sua atividade têm sido apontadas como sensíveis às alterações na qualidade do solo, causadas por mudanças de uso e práticas de manejo, assim como, são influenciados pelas suas propriedades físico-químicas (KUJUR & PATEL, 2012).

A importância do estudo do BMS tem crescido nos últimos anos, pois conforme SIQUEIRA e FRANCO (1988) está relacionado a inúmeros processos: decomposição de resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes, solubilização de nutrientes, degradação de compostos xenobióticos e de poluentes, estruturação do solo, controle biológico de patógenos, sendo reconhecida, portanto, como um componente importante para a qualidade e produtividade do solo, e responde mais rapidamente a mudanças ambientais que qualquer outro parâmetro agrônomo, correspondendo ao C orgânico (KASCHUK et al., 2009).

A respiração microbiana corresponde à oxidação da matéria orgânica por organismos do solo, que, portanto utilizam o O₂ como aceptor final de elétrons, até CO₂ (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), sendo resultante da atividade exclusiva das bactérias, fungos, algas, e protozoários no solo e, incluem as trocas gasosas provenientes dos metabolismos aeróbio e anaeróbio (ANDERSON, 1982).

Sendo assim, essa microbiota é a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia dentro do solo, exercendo influência tanto na transformação da matéria orgânica, quanto na estocagem do carbono e nutrientes minerais, com consequente liberação de CO₂ para a atmosfera (JENKINSON & LADD, 1981).

A respiração microbiana é o parâmetro mais antigo utilizado na quantificação da atividade metabólica nos solos, sendo realizada em laboratório em condições de temperatura e umidade controladas. Assim como outras atividades metabólicas, a respiração é dependente do estado fisiológico da célula e é influenciada por diversos fatores no solo, tais como umidade, temperatura, estrutura e disponibilidade de nutrientes (GONÇALVES et al., 2002; ALLEN & SCHLESINGER, 2004).

O qCO₂ indica a eficiência da biomassa microbiana em utilizar o carbono disponível para biossíntese (SAVIOZZI et al., 2002). Dessa forma, um baixo qCO₂ indica economia na utilização de energia e, supostamente reflete um ambiente mais estável ou mais próximo do seu estado de equilíbrio. Valores elevados são indicativos de ecossistemas submetidos a alguma condição de estresse ou de distúrbio (TÓTOLA & CHAER, 2002).

Alguns resultados recentes verificaram que a selamectina, anti-helmíntico veterinário da família das avermectinas, frequentemente utilizado, inibiu o crescimento de micobactérias em ágar e culturas líquidas (LIM et al., 2013). Este é um resultado surpreendente, pois se pensava que as avermectinas fossem efetivas contra helmintos, insetos e aracnídeos, sendo inativos contra anelídeos, protozoários, bactérias e fungos (ÔMURA & CRUMP, 2004; NAGAI et al., 2004).

O impacto dos fármacos aos micro-organismos pode afetar o desenvolvimento das plantas cultivadas no solo contaminado, pois os micro-organismos desempenham papel importante na decomposição de resíduos orgânicos e na formação de húmus. Os produtos do metabolismo microbiano que são liberados na rizosfera estimulam o crescimento das plantas, ocorrendo assim

uma troca de elementos entre o sistema radicular das plantas e os micro-organismos. O número de micro-organismos na rizosfera é muito maior do que no solo livre (CARDOSO & FREITAS, 1992). Desta forma, o resíduo de anti-helmínticos pode trazer efeitos negativos nos micro-organismos do solo e no crescimento de plantas. O objetivo deste trabalho é avaliar o impacto do resíduo de moxidectina, presente nas fezes de ovinos utilizadas como adubo orgânico, sobre a microbiologia do solo, bem como determinar os efeitos no crescimento do sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Universidade Federal do Paraná, Departamento de Solos e Engenharia Agrícola, em casa de vegetação, Curitiba-PR, obedecendo ao delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (6 x 5), sendo seis doses de moxidectina (0, 75, 300, 600, 1500 e 3000 ng.g⁻¹ de fezes secas) e cinco épocas de avaliação (0, 7, 14, 21 e 28 dias), com seis repetições.

As unidades experimentais foram representadas por vasos de polietileno com capacidade de 5 L, contendo em média 3.176,84 ± 97,72 g de solo Latossolo Vermelho Amarelo, coletado de área de pastagem pertencente ao Laboratório de Produção e Pesquisa de Ovinos e Caprinos da UFPR – LAPOC/UFPR que havia permanecido sem a presença de animais por um período superior a seis meses, evitando a contaminação por medicamentos que pudessem interferir nos resultados.

As análises físico-químicas do solo revelaram os seguintes atributos: areia = 454 g kg⁻¹; silte = 46 g kg⁻¹; argila = 500,00 g kg⁻¹; pH (CaCl₂) = 5,0; pH (SMP) = 5,90; H⁺+Al³⁺ = 5,40 cmol_c dm⁻³; Ca = 4,60 cmol_c dm⁻³; Mg = 2,50 cmol_c dm⁻³; SB = 7,22 cmol_c dm⁻³; K = 0,12 cmol_c dm⁻³; CTC pH 7,0 = 12,62 cmol_c dm⁻³; P = 4,80 mg dm⁻³; C = 21,20 g dm⁻³; V = 57,00%; Ca/Mg = 1,80.

4.2.1 Contaminação das fezes

Cinco carneiros de aproximadamente 30 meses das raças Suffolk, White Dorper e Dorper, com $115,95 \pm 14,82$ kg e produção diária de fezes de $3,63 \pm 0,80$ kg foram mantidos em aprisco suspenso ripado sem receber medicamentos por mais de 10 meses. A dieta foi composta por 44,3% de concentrado e 55,7% de volumoso (feno de azevém), segundo o NRC (2007), fornecida *ad libitum*, duas vezes ao dia, com sobra diária de 10% para não limitar o consumo. Foram colocadas bolsas coletoras nesses animais para a coleta de fezes, por um período de 24 horas.

O montante de fezes foi seco em estufa a 65°C por 72 h, moído e tamizado em peneira de 2 mm e armazenado em sacos plástico de polietileno. Estas continham 1,7% de N, 37,9% de C e 33,0% de MS, cuja análise de C e N foi obtida pela técnica do Vario EL // analyzer (Elementar Analysensystem e GmbH, Hanau, Germany).

A umidade do solo foi elevada a 40% da capacidade de retenção de água (CRA), conforme MONTEIRO & FRIGUETTO (2000), para assegurar a máxima atividade microbiana no solo. Concomitantemente, foi determinada a CRA das fezes ($118\text{ mL}\cdot 100\text{ g}^{-1}$). Adicionou-se em 80 g de fezes secas a solução de moxidectina específica para cada tratamento, juntamente com a água deionizada utilizada para elevar a CRA, sendo posteriormente misturada ao solo, considerando-se que 1 mL do vermífugo Cydectin© contem $10.000\ \mu\text{g}$ de Moxidectina. Após a homogeneização, a unidade experimental (solo + fezes com ou sem moxidectina) foi colocada dentro dos vasos e levada à casa de vegetação.

Durante o período de condução da pesquisa, foi monitorada a temperatura mínima e máxima da casa de vegetação, que oscilou entre $11,5 \pm 3,8\ ^\circ\text{C}$ e $31,5 \pm 6,6\ ^\circ\text{C}$, respectivamente (Figura 13). A perda de umidade dos vasos, em consequência da evaporação, foi controlada por pesagem dos vasos, com reposições diárias.

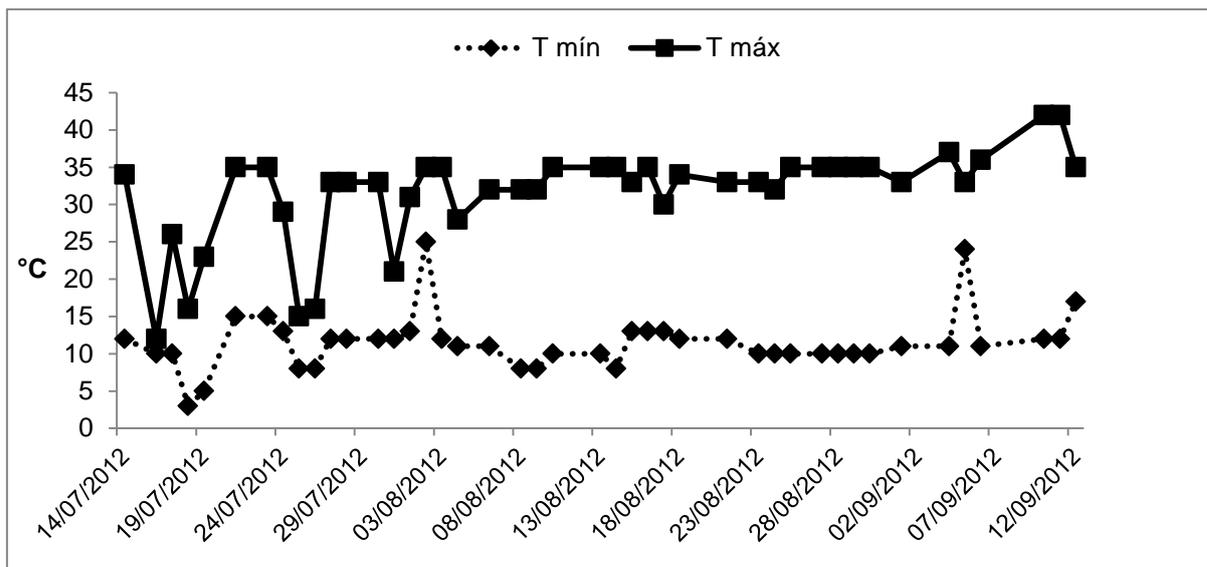


FIGURA 13 - Temperaturas máxima e mínima (°C) diárias na casa de vegetação durante o período experimental, de 14 de julho a 12 de setembro de 2012, PR, Brasil.

4.2.2 Avaliações microbiológicas

Foram coletadas amostras de solo de aproximadamente 300 g.vaso⁻¹ por tratamento, nas datas previamente determinadas para avaliação, sendo que para as avaliações de biomassa microbiana e respiração microbiana realizou-se uma avaliação por tratamento aos 56 dias após início do experimento.

4.2.3 Densidade populacional de micro-organismos

As avaliações das populações microbianas do solo, representadas pelos grupos bactérias, actinobactérias e fungos foram realizadas pela técnica da diluição decimal em série e contagem em placa de Petri. Foram realizadas diluições a partir de 10 g de solo. A amostra foi transferida para um frasco contendo 90 mL de solução salina (HUNGRIA & ARAÚJO, 1994), previamente esterilizadas. A suspensão formada (solo + solução) foi agitada a 250 rpm durante 15 minutos em agitador mecânico de movimentação circular. Dessa suspensão foram realizadas as

diluições decimais seriais. Para as densidades populacionais de bactérias e actinobactérias foram utilizadas as diluições 10^4 , 10^5 e 10^6 , inoculando-se 0,1 mL da suspensão por diluição, espalhadas com a alça de Drigalsky, na superfície de três placas de Petri, contendo o meio de cultura de Thorton (PARKINSON et al., 1971) e Caseinato-Dextrose-Ágar (CLARK et al., 1965), respectivamente. Já para a avaliação da densidade de fungos foram utilizadas as diluições 10^2 , 10^3 e 10^4 e o meio de cultura de Martin (MENZIES, 1965). Após um período de incubação de sete dias a 25°C, foram realizadas as contagens do número de unidades formadoras de colônias (UFC.g⁻¹).

4.2.4 Respiração microbiana do solo ou respiração basal (RB)

Para determinação da respiração microbiana do solo, ou respiração basal (RB), utilizou-se o sistema estático, sem aeração, conforme ALEF (1995), no qual as amostras de solo (30 g solo seco) foram incubadas em frascos de polietileno, com capacidade para 1 L, hermeticamente fechados, na presença de NaOH 0,5 N padronizado e mantidos em estufa a 25° C. Após o período de sete dias, o excesso da base foi titulado com HCl 0,5 N e estimada a RB de acordo com MOREIRA & SIQUEIRA (2006).

4.2.5 Carbono da biomassa microbiana

Anteriormente à determinação da biomassa microbiana do solo (BMS), realizou-se o teste de calibração da respiração induzida pelo substrato (CRIS), conforme LIN & BROOKES (1999), para se determinar a dose de carbono prontamente disponível que mantém a respiração microbiana do solo estabilizada em função do tempo. Foram testadas doses crescentes de glicose (30, 60, 120, 180 e 300 mg), adicionadas ao solo (30 g solo seco) com tempos de incubação de 1, 2, 3, 4 e 5 h, à temperatura de 22°C. A estabilização da liberação de CO₂, ou seja, a

CRIS das amostras de solo foi obtida com a dosagem máxima de glicose (300 mg) e incubação por 4 h. Dessa forma, após a calibração, determinou-se a respiração induzida pelo substrato (RIS) de forma similar à RB.

A BMS foi estimada pela equação ($B = 40,04 X + 0,37$), onde B = biomassa microbiana ($\mu\text{g C g}^{-1}$) e X = taxa de respiração ($\mu\text{g C h}^{-1} \text{g}^{-1}$), conforme LIN & BROKES (1999).

4.2.6 Quociente metabólico

O quociente metabólico $q\text{CO}_2 = \text{respiração microbiana } (\mu\text{g C-CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{g}^{-1}) / \text{biomassa microbiana } (\mu\text{g C g}^{-1})$ foram estimados a partir dos dados da RB, BMS conforme (SAMPAIO et al., 2008).

4.2.7 Nitrato e Amônio do solo

Após 56 dias de instalação do experimento foi realizada uma amostra composta, coletando-se 50 g de solo.vaso⁻¹.tratamento⁻¹, para determinação dos teores de amônio e nitrato. Utilizou-se 150 mL de KCl 1N para a extração do nitrato e do amônio, para posterior destilação com arraste de vapor (semi-microkjeldahl), segundo TEDESCO (1995).

4.2.8 Crescimento do sorgo

Aos 63 dias, o peso dos vasos foi uniformizado em 2 kg e, semeadas cinco sementes de sorgo granífero (*Sorghum vulgare* Pers.). Avaliou-se a quantidade de plantas que emergiram e três plantas foram selecionadas para avaliações semanais

do crescimento, com a mensuração da altura semanal até os 28 dias, por meio de uma régua graduada em centímetros.

Durante o período de condução da pesquisa, foi monitorada a temperatura máxima e mínima da casa de vegetação, que oscilou entre $38,3 \pm 5,7$ °C e $12,5 \pm 7,9$ °C, respectivamente (Figura 14). A perda de umidade dos vasos, em consequência da evaporação, foi controlada com reposições diárias.

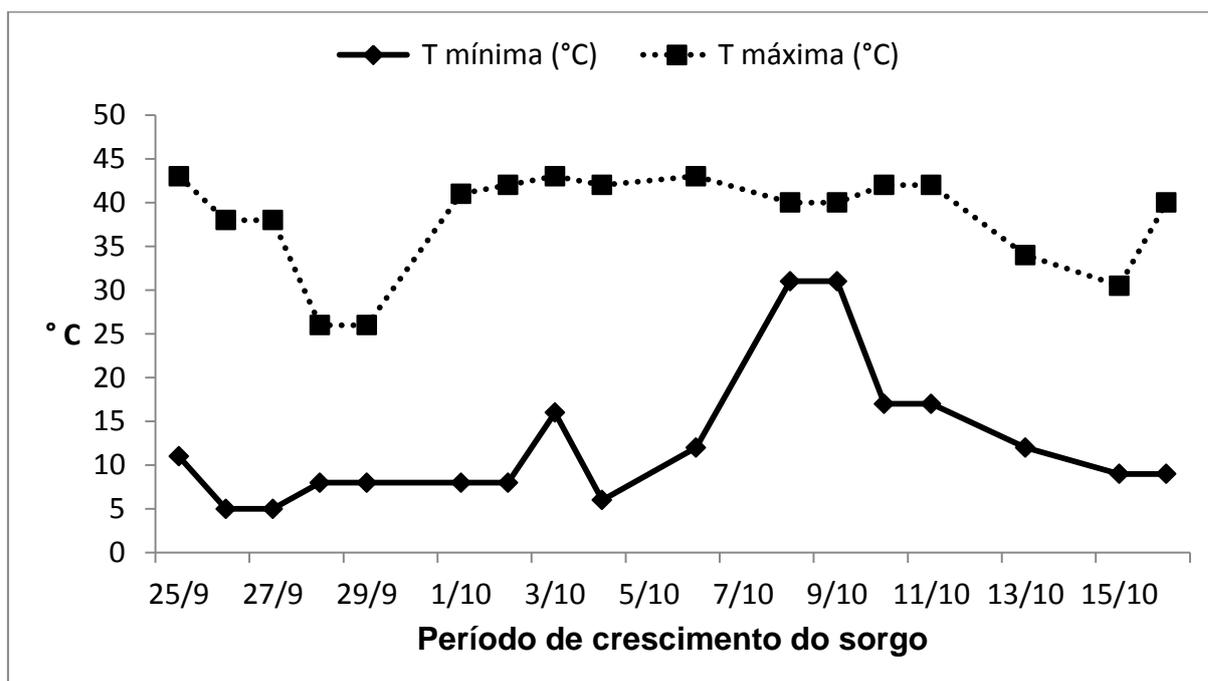


FIGURA 14 - Temperaturas máxima e mínima (°C) diárias na casa de vegetação durante o período de crescimento do sorgo, 25 de set a 16 de out de 2012, Curitiba, PR, Brasil

No momento da coleta, as plantas foram divididas em raízes e parte aérea. Para determinação da massa de raízes, o sistema radicular foi lavado com água destilada, seco com papel absorvente.

A determinação da área (cm²) foliar e do colmo foi realizada no Laboratório de Fitotecnia da UFPR, utilizando um scanner óptico acoplado ao programa Win Rhizo_ pró v. 2002c (RÉGENT INSTRUMENTS INC., 2004).

Logo após, foi determinada a massa seca da parte aérea e da raiz que foram obtidas após secagem em estufa a 65 °C por 72 h e pesagem em balança analítica com precisão de centésimo de grama.

Após secagem, as amostras foram moídas e tamizadas em peneiras de malha 2 mm, para determinação de nitrogênio (N-total) e carbono (C-total) por digestão via seca, pela técnica do Vario EL // analyzer[®] (Elementar Analysensystem e GmbH, Hanau, Germany),

4.2.9 Análise estatística

As variáveis foram analisadas em delineamento inteiramente casualizados e com medidas repetidas no tempo, pelo procedimento estatístico MIXED do SAS, com exceção das variáveis referentes aos constituintes morfológicos do sorgo (peso seco de raiz (kg), peso seco da parte aérea (kg) e área (cm²) de folhas, colmo e parte aérea) que foram analisadas pelo procedimento estatístico GLM do SAS. Adicionalmente, foi realizada a análise de regressão polinomial determinada pelos contrastes linear, quadrático e cúbico. Por não apresentarem distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilks, as variáveis respiração, biomassa microbiana e qCO₂ foram transformadas em Log₁₀, x^{1.5} e √, respectivamente. Entretanto, as médias aritméticas foram reportadas com os dados não transformados.

4.3 RESULTADOS

A densidade populacional de micro-organismos (bactérias, actinobactérias e fungos) não foi afetada pelos níveis crescentes de moxidectina até 3000 ng.g⁻¹ de MS de fezes misturadas ao solo (Tabela 10). Para esta variável, houve variação entre os períodos (P<0,01) (Tabela 9), entretanto, não houve efeito de interação entre tratamento e período (P>0,05) (Tabela 10). As densidades populacionais dos micro-organismos bactéria, fungos e actinobactérias foram superiores no momento da incubação, ocorrendo redução com ao longo do tempo (Tabela 9). Entretanto, aos 28 dias houve acréscimo significativo na densidade populacional de fungos em

relações aos períodos anteriores, provavelmente, em consequência do aumento da temperatura, neste período (Tabela 9).

TABELA 9 - Densidade populacional (UFC.g⁻¹) de bactérias, actinobactérias e fungos em solo adubado com fezes de ovinos contendo moxidectina, até aos 28 dias após contaminação (dados não transformados)

Variáveis	Períodos (dias)				
	0	7	14	21	28
Bactérias (x10 ⁸)	6,21a	2,38b	2,44b	1,38c	1,43c
Actinobactérias (x10 ⁸)	6,52a	2,10b	2,25b	1,66bc	1,40c
Fungos (x10 ⁴)	1,80b	1,50bc	1,25c	1,78b	9,61a

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem (P<0,05) pelo teste de Tukey.

TABELA 10 – Densidade populacional (UFC.g⁻¹) de bactérias, actinobactérias e fungos em solo adubado com fezes de ovinos contendo níveis crescentes de resíduo de moxidectina (dados não transformados)

Variáveis	Doses (ng.g ⁻¹)						T ¹	P ²	T * P ³
	0	75	300	600	1500	3000			
Bactérias (x10 ⁸)	2,90	2,70	2,68	2,85	2,42	3,14	0,161	<0,01	0,992
Actinobactérias (x10 ⁸)	2,26	2,92	3,33	2,68	2,22	3,19	0,101	<0,01	0,963
Fungos (x10 ⁴)	3,26	3,25	4,22	2,13	2,06	2,80	0,744	<0,01	0,997

¹T: Valor de P para o teste de polinômio ortogonal

²P: Efeito de períodos.

³T*P: Efeito de interação entre tratamentos e períodos.

A atividade dos micro-organismos foi prejudicada pela presença do resíduo de moxidectina, visto que a respiração microbiana em $\mu\text{gC-CO}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (35,6; 31,7; 30,0; 29,3; 26,7; 26,5) decresceu linearmente ($P<0,01$), estabilizando a partir da concentração de $1500\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de fezes (Tabela 11). Os resultados de biomassa microbiana em $\mu\text{gC}\cdot\text{g}^{-1}$ (268,2; 248,2; 227,0; 221,5; 219,9; 209,7) reafirmam este efeito, ao apresentar redução linear ($P<0,10$) com o aumento dos níveis de moxidectina nas fezes misturadas ao solo (Tabela 11). Observou-se tendência crescente da respiração em função da biomassa microbiana (Figura 15). Este comportamento da corrobora com o resultado de $q\text{CO}_2$, que não foi afetado significativamente ($P>0,05$) pelas doses do vermífugo moxidectina. Para estas variáveis, não houve efeito de interação entre tratamento e período ($P>0,05$), entretanto, foram afetadas pelo período de avaliação ($P<0,01$). A quantidade de C-CO_2 liberada foi superior no período de incubação ($40,01\ \mu\text{g C-CO}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), mantendo-se até 21 dias ($36,13\ \mu\text{g C-CO}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). Após este período houve decréscimo linear até ao final do período experimental (56 dias após a incubação).

Efeitos inibitórios não foram observados na amonificação, visto que a concentração de amônio ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) não diferiu ($P>0,05$) entre os tratamentos, conforme Figura 5. Entretanto, observou-se que a nitrificação foi comprometida, devido à redução significativa na concentração de nitrato em $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($P<0,05$) nas amostras que continham o resíduo de moxidectina, independente da concentração aplicada (Figura 16).

Apesar dos efeitos inibitórios na atividade microbiana do solo, o crescimento do sorgo foi pouco afetado pela inclusão do fármaco no solo, visto que a maioria das variáveis utilizadas para avaliar o crescimento do sorgo não foi afetada ($P>0,05$) pela inclusão de níveis crescentes do vermífugo MOX nas fezes de ovinos utilizadas para adubar o solo. Apenas, o peso de raiz apresentou comportamento cúbico, com a inclusão do fármaco (Tabela 12).

TABELA 11 - Respiração microbiana ($\mu\text{gC-CO}_2\text{.g}^{-1}\text{.h}^{-1}$), biomassa ($\mu\text{gC.g}^{-1}$) microbiana e qCO_2 em solo adubado com fezes de ovinos contendo níveis crescentes de resíduo de moxidectina

Variáveis	Doses (ng.g^{-1})						T ¹			P ²	T * P ³
	0	75	300	600	1500	3000	L	Q	C		
Respiração	35,56	31,74	30,01	29,34	26,71	26,53	<0,01	0,688	0,889	<0,01	0,563
Biomassa	268,22	248,25	227,03	221,53	219,88	209,69	<0,01	0,840	0,628	<0,01	0,502
qCO_2	50,40	47,71	45,92	42,27	42,99	44,19	0,172	0,679	0,962	<0,01	0,611

¹T: Valor de P para o teste de polinômio ortogonal

²P: Efeito de períodos.

³T*P: Efeito de interação entre tratamentos e períodos.

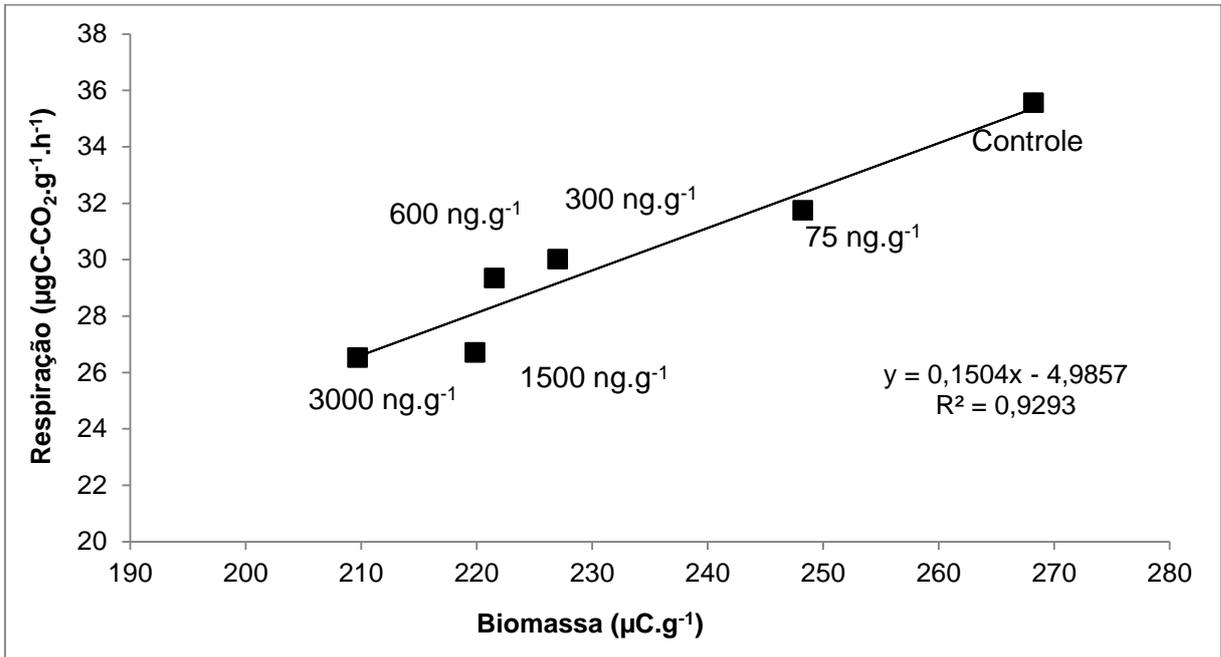


FIGURA 15 - Análise de regressão entre a respiração e a biomassa microbiana em solo adubado com fezes de ovinos contendo níveis crescentes de resíduo de moxidectina

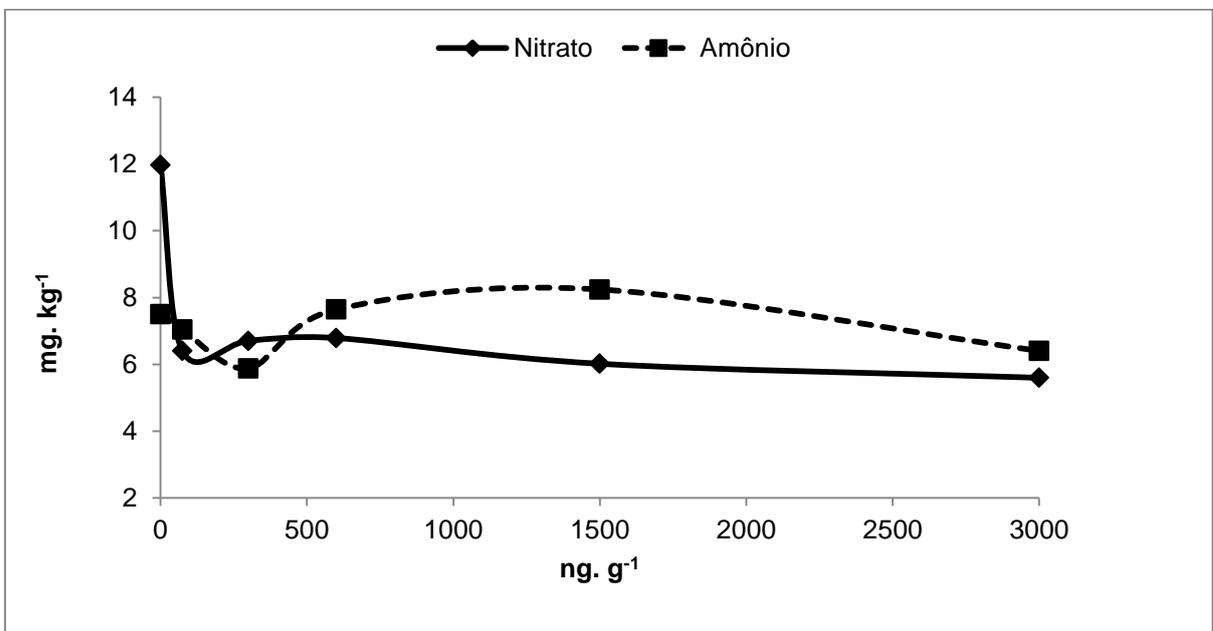


FIGURA 16 - Concentração de Amônio e Nitrato (mg.kg⁻¹) em solo adubado com fezes de ovinos contendo níveis crescentes de resíduo de moxidectina

TABELA 12 - Parâmetros do crescimento do sorgo cultivado em solo adubado com esterco de ovino contaminado com níveis crescentes de moxidectina (0, 75, 300, 600, 1500 e 3000 ng.g⁻¹)

Variáveis	Doses (ng. g ⁻¹)						EPM ¹	P ²		
	0	75	300	600	1500	3000		L	Q	C
Carbono, %	39,12	39,74	39,50	39,37	39,48	38,63	0,152	0,705	0,218	0,474
Nitrogênio, %	3,56	3,32	3,38	3,50	3,45	3,35	0,056	0,814	0,173	0,657
Massa seca										
Parte aérea, g	0,692	0,705	0,688	0,727	0,743	0,693	0,018	0,629	0,759	0,641
Folha, g	0,497	0,492	0,482	0,493	0,528	0,492	0,011	0,965	0,674	0,783
Colmo, g	0,197	0,212	0,205	0,230	0,215	0,203	0,008	0,204	0,757	0,463
Raiz, g	0,534	0,535	0,630	0,547	0,530	0,498	0,012	0,343	0,137	<0,05
Área foliar, cm ²	187,55	198,01	189,22	191,07	203,76	185,50	4,435	0,969	0,672	0,512
Área do colmo, cm ²	8,73	7,98	7,73	8,50	8,85	7,85	0,240	0,719	0,207	0,843

¹EPM: erro padrão da média

²P: polinômios ortogonais

TABELA 13 – Altura final do sorgo cultivado em solo adubado com esterco de ovino contaminado com níveis crescentes (0, 75, 300, 600, 1500 e 3000 ng.g⁻¹ de moxidectina)

Variáveis	Doses (ng. g ⁻¹)						EPM ¹	T ²
	0	75	300	600	1500	3000		
Altura final, cm	33,27	32,83	32,70	34,60	33,40	33,50	0,746	0,684

¹EPM: erro padrão da média

²T: efeito de tratamento

4.4 DISCUSSÃO

Em geral, a densidade dos micro-organismos foi superior no momento da incubação, ocorrendo à redução com o passar das avaliações. Este comportamento pode ser atribuído à disponibilidade de nutrientes com a inclusão de esterco e gradual esgotamento, visto que a adubação foi realizada, apenas, no início do experimento.

A densidade populacional de fungos teve aumento significativo aos 28 dias após a inclusão de fezes, independente da presença ou não de resíduo, ao mesmo tempo em que houve elevação da temperatura. Desta forma, a densidade populacional dos micro-organismos foi afetada pelas condições ambientais, principalmente com elevação da temperatura e, pela disponibilidade de substrato. Resultados semelhantes, também, foram observados em regiões de cerrado brasileiro (PINTO et al., 2009).

Os resultados desta pesquisa demonstram que não houve efeito da aplicação do fármaco moxidectina nas doses testadas em relação à densidade populacional de micro-organismos. Vários estudos demonstraram que os métodos clássicos, como aqueles que envolvem o isolamento e subsequentemente cultivo de micro-organismos, são menos precisos, pois subestima a comunidade microbiana (OLSEN & BAKKEN, 1987; FAEGRI et al., 1977). Somente pequena parte dos micro-organismos replica nos meios de cultura, devido à sua grande diversidade metabólica (FRIQUETTO & SCHNEIDER, 2000).

Em recentes pesquisas, LIM et al. (2013) examinaram o efeito antibacteriano de quatro avermectinas (doramectina, ivermectina, moxidectina e selamectina) e não observaram efeito inibitório para as bactérias, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. lividans*, *Kocuria rhizophila*, e *Staphylococcus aureus*. Entretanto, todas as quatro avermectinas inibiram o crescimento de *Mycobacterium bovis* BCG e *M. tuberculosis* de estirpes laboratoriais em concentrações variando de 1 a 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Esta atividade antimicrobiana foi considerada inesperada visto que as avermectinas são consideradas efetivas contra helmintos, insetos e aracnídeos, e inativos contra anelídeos, protozoários, bactérias e fungos (NAGAI et al., 2004; ÔMURA & CRUMP, 2004).

São poucos os trabalhos que avaliaram a toxicidade de anti-helmínticos contra micro-organismos. HALLEY et al. (1988) ao introduzir fezes com a presença de ivermectina obtiveram que a concentração no solo deste resíduo era de $0,2 \text{ ng.g}^{-1}$ contendo $0,09 \text{ ng.g}^{-1}$ de ivermectina não modificada; desta forma, concluíram que estas concentrações não seriam capazes de proporcionar efeitos nos processos de micro-organismos no solo, sendo que os efeitos na nitrificação e respiração seriam verificados em concentrações superiores a 30 ng.g^{-1} . As baixas concentrações observadas no solo podem estar relacionadas com a baixa solubilidade à água com coeficiente de partição ($6,0 \text{ Log } K_{o/w}$) elevados, caracterizando-se como substância lipofílica, permanecendo no bolo fecal até sua degradação total. Entretanto, ao adicionar as fezes com a presença de resíduo de moxidectina como adubo orgânico, provavelmente, a concentração em contato com os micro-organismos seja maior.

No presente estudo, as determinações da biomassa microbiana e respiração microbiana são consideradas mais representativas das alterações ocorridas no solo. Desta forma, apesar da densidade populacional de micro-organismos (bactérias, actinobactérias e fungos) não ter sido afetada, a molécula de moxidectina proporcionou efeito prejudicial aos micro-organismos, visto que a respiração e a biomassa decresceram linearmente, bem como a nitrificação reduziu 50% com inclusão de moxidectina independente da dose utilizada.

O nitrogênio é um dos mais importantes nutrientes para manutenção da produtividade das gramíneas forrageiras, de acordo com CORSI (1984), este elemento promove alterações fisiológicas nestas plantas, como no tamanho e na massa seca da planta, taxa de aparecimento de perfilhos e folhas e alongamento de como, que são fatores intrínsecos na produção de massa seca e valor nutritivo da planta forrageira.

A amonificação e nitrificação no solo são essencialmente microbiológica. As duas fases são importantes, pois as plantas são capazes de absorver o nitrogênio tanto na forma amoniacal quanto na forma nítrica (ANDRADE et al., 1994). Ao analisar os dados obtidos, pode-se constatar que houve redução no processo de nitrificação para os tratamentos com a presença da moxidectina nas fezes, sugere-se que este fármaco afeta negativamente as bactérias gram negativas da família Nitrobacteriaceae, que são responsáveis por este processo que realizam a oxidação de amônio em nitrato, via nitrito (ANDRADE et al., 1994).

Os resultados descritos evidenciam que os efeitos na atividade microbiana e na biomassa microbiana proporcionada pela moxidectina aos micro-organismos ocorrem em condições usualmente visualizadas a campo, visto que a concentração máxima nas fezes pode alcançar 350 ng.g^{-1} de fezes de ovinos (SANHUEZA, 2006) e, os danos foram evidenciados, logo, em concentrações inferiores (75 ng.g^{-1} de fezes).

A estimativa da biomassa microbiana e da respiração forneceu dados úteis sobre a modificação das propriedades biológicas, decorrente da inclusão do resíduo de moxidectina, sendo que com o aumento na dose deste fármaco, houve redução no carbono da biomassa microbiana, refletindo conseqüentemente na atividade microbiana.

Apesar do efeito na atividade microbiana do solo, o desenvolvimento do sorgo não foi afetado pela inclusão fármaco na mistura fezes + solo. Este fato pode estar relacionado com a característica da molécula e o tempo reduzido de avaliação, visto que houve efeito prejudicial no desenvolvimento da raiz (g) cujo peso seco foi menor em solos com a presença da molécula. A moxidectina pertencendo ao grupo das lactonas macrocíclicas possui massa molecular ($639,4 \text{ g.mol}^{-1}$) e valor de coeficiente de partição ($6,0 \text{ Log } K_{o/w}$) elevados, caracterizando-se como substância hidrofóbica, de baixa volatilidade e solubilidade em solventes polares, com forte afinidade por lipídeos, solo e matéria orgânica. Quando as fezes contendo moxidectina são misturadas ao solo adjacente a essa placa, tende a ser fortemente ligada a matéria orgânica das fezes e pode persistir no solo e no meio orgânico por vários meses, ou possivelmente por anos, particularmente em condições anaeróbicas (FLOATE et al., 2005).

Os produtos veterinários podem ser absorvidos pelas plantas, o que eventualmente pode interferir em seu crescimento e desenvolvimento, bem como os organismos que delas se alimentam podem absorvê-los (REGITANO & LEAL, 2010). Entretanto, o efeito desses componentes para as plantas depende de vários fatores como: natureza do composto, concentrações envolvidas, cinética de sorção e mobilidade do produto (JJEMBA, 2002). Desta forma, foram observadas concentrações dos compostos florfenicol, levamisole e trimetoprina em folhas de alface, BOXALL et al. (2006), enquanto os compostos diazinon, enrofloxacin, trimetoprina e florfenicol foram detectados nas raízes de cenoura.

4.6 CONCLUSÕES

O anti-helmíntico moxidectina presente nas fezes de ovinos utilizadas como adubo orgânico proporcionou impacto negativo aos micro-organismos do solo, decrescendo linearmente a atividade microbiana (respiração e nitrificação) e a biomassa microbiana com o aumento da dose utilizada (0 a 3000 ng.g⁻¹ de fezes seca), sendo estas usualmente excretadas pelos animais desverminados. Entretanto, este efeito não mostrou-se prejudicial ao crescimento do sorgo, visto que a redução no peso da raiz foi verificada, apenas, na concentração mais elevada (3000 ng.g⁻¹).

REFERÊNCIAS

ABELLO, M. Microbiologia ambiental. Engenharia do Ambiente, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Coimbra. Disponível em: <www.esac.pt/abello>. Acesso em: 31 out. 2013.

ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF. K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press Limited, 1995. p. 225-227.

ALLEN, A.S.; SCHLESINGER, .H. Nutrient limitations to soil microbial biomass and activity in loblolly pine forests. **Soil Biology and Biochemistry**, n.36, p. 581-589, 2004.

ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. Ratios of microbial biomass carbón to total organic carbón in arable soils. *Soil biology & Biochemistry*, v. 21, p.471-479, 1982.

ANDRADE, D.S.; MIYAZAWA, M.; HAMAKAWA, P.J. Microrganismos amonificadores e nitrificadores. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Ed.). Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: EMBRAPA, 1994. cap. 17, 356-376.

BOXALL, A.B.A.; JOHNSON, P.; SMITH, E.J.; SINCLAIR, C.J.; STUTT, E. & LEVY, L.S. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**. v. 54, p. 2288-2297, 2006.

BRAZ, S.P.; NASCIMENTO JR., D.; CANTARUTTI, R.B.; REGAZZI, A.J.; MARTINS, C.E. FONSECA, D.M. da. Aspectos quantitativos do processo de reciclagem de nutrientes pelas fezes de bovinos sob pastejo em pastagem de *Brachiaria decumbens* na zona da Mata de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.858-865, 2002.

CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, S.S. A rizosfera. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. & NEVES, M.C.P., eds. Microbiologia do solo. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.41-57. 1992.

CLARK, F.E. Aerobic spore – forming bacteria. In: BLACK, C.A. Methods of soil analysis. Madison, **American Society of Agronomy**, 1965. v.2. p.1473-1476.

CORSI, M. Effects of nitrogen rates and harvesting intervals on dry matter production, tillering and quality of the tropical grass *Panicum maximum* Jacq. Ames, 1984. 125p. Thesis (PhD) – The Ohio State University.

FAEGRI, A.; LID TORSVIK, V.; GOKSOYR, J. Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacteria and fungi by a rapid fractionation centrifugation technique. *Soil Biology and Biochemistry*, v.9, p. 105-112, 1977.

FERNANDES, M.A.M.; BARROS, C.S.; PINTO, S. Exame de fezes em caprinos e ovinos é uma necessidade. IEPEC. Disponível em: <<http://www.iepec.com/noticia/exame-de-fezes-em-caprinos-e-ovinos-e-uma-necessidade>> Acesso em: 31out. 2013.

FORT DODGE ANIMAL HEALTH. 1997. Environmental assessment cydectin moxidectin 0.5% pour on cattle. *Doc. N.º. Z154314*, Fort Dodge Anim. Health, Overland Park, Kans.

FRIGUETTO, R.T.S.; SCHNEIDER, R.P. Problemas encontrados na avaliação de micro-organismos do solo. In: FRIGUETTO, R.T.S.; VALARINI, P.J. Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo: Manual técnico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 198p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 21).

GONÇALVES, A.S.; MONTEIRO, M.T.; GUERRA, J.G.M.; DE-POLLI, H. Biomassa microbiana em amostras de solos secadas ao ar e reumedecidas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n.5, p.651-658, 2002.

HALLEY, B.A.; JACOB, T.A.; LU, A.Y.H. The environmental impact of the use of ivermectin: environmental effects and fate. **Chemosphere**. v. 18, p. 1543–1563, 1989.

HALLEY, B.A.; VANDENHEUVEL, W.J.A.; WISLOCKI, P.G. Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. **Veterinary Parasitology**. v. 48, p. 109–125, 1993.

HAYNES, R.J.; WILLIAMS, P.H. Nutrient cycling and fertility in the grazed pasture ecosystem. **Advances in Agronomy**. v. 49, p.119-199, 1993.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Goiania: Embrapa-CNPAP; Londrina: Embrapa-CNPSo; Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 542 p. (Embrapa-CNPAP. Documentos, 46).

JENKINSON, D.S.; LADD, J.N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E.A.; LADD, J.N. (eds). **Soil biochemistry**. Marcel Dekker, p.425-471, 1981.

JJEMBA, P.K. The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: A review. **Agriculture, Ecosystems, Environment**. v. 93, p. 267-278, 2002.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 1-13, 2009.

KUJUR, M.; PATEL, A.K. Quantifying the contribution of different soil properties on microbial biomass carbon, nitrogen and phosphorous in dry tropical ecosystem. **International Journal of Environmental Sciences**, n.3, 2272-2284, 2012.

LIM, L.E.; VILCHÈZE, C.; NG, C.; JACOBS, W.R.; RAMÓN-GARCÍA, S.; THOMPSON, C.J. Anthelmintic avermectins kill Mycobacterium tuberculosis, including multidrug-resistant clinical strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 1040 - 1046, 2013.

LIN, Q.; BROOKES, P.C. Comparison of substrate induced respiration, selective inhibition and biovolume of microbial biomass and its community structure in unamended, ryegrass-amended, fumigated and pesticide-treated soils. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 31, p. 1999-2114, 1999.

MATHEWS, B.W.; SOLLENBERGER, L.E. **Grazing systems and spatial distribution of nutrients in pastures: soil considerations**. In: NUTRIENT CYCLING IN FORAGE SYSTEMS. 1996, Columbia, Proceedings... JOOST, R. E. and ROBERTS, C. A. (eds.). Columbia: University of Missouri, 1996. p. 213-229.

MDIC. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, 2012. Disponível em: <http://www.farmpoint.com.br/cadeia-produtiva/conjuntura-de-mercado/o-mercado-domestico-da-carne-ovina-em-2012-83144n.aspx> Acesso em: 17 de jan de 2013.

MENZIES, J.D. Fungi. In: BLACK, C.A., ed. Methods of soil analysis. Madison, American Society of Agronomy. v. 2, p. 1502 – 1505, 1965.

MERCK and COMPANY. 1996. Ivomec eprinex (epinomectin) pour on for beef and dairy cattle: environmental assessment. *Rep. NADA 141-079EA*, Merck and Company., Rahway, NJ.

MONTEIRO, R.T.R.; FRIGUETTO, R.T.S. 2000. Determinação da umidade, pH e capacidade de retenção de água do solo. In: Frighetto, R.T.S.; Valarini, P.J. (Coords.). *Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo: manual técnico*. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna. 198p. (Embrapa Meio Ambiente. Documento, 21).

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras:UFLA, 2^o Ed., p. 729, 2006.

MULROY, A. *Monitoring and Analysis of Water and Wastes*. *Water Environment Technology*. v.13, n.2, p. 32-36, 2001.

NAGAI, K.; SHIOMI, K.; SUNAZUKA, T.; HARDER, A.; TURBERG, A.; OMURA, S. Synthesis and biological evaluation of novel 4_-alkoxy avermectin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 14, p. 4135– 4139, 2004.

NOGUEIRA, D.M.; MISTURA, C.; TURCO, S.H.N.; VOLTOLINI, T.V.; ARAÚJO, G.G.L.de; SOUZA, T.C. de. Aspectos clínicos, parasitológicos e produtivos de ovinos mantidos em pastagem de capim-aruana irrigado e adubado com diferentes doses de nitrogênio. ***Acta Scientiarum. Animal Sciences***. v. 33, p. 175-181, 2011.

OLSEN, R.A.; BAKKEN, L.R. Viability of soil bacteria: optimization of the plate-count technique. *Microbial Ecology*, v. 13, p. 59-74, 1987.

ÔMURA, S.; CRUMP, A. The life and times of ivermectin—a success story. *Nature Reviews Microbiology*. v. 2, p. 984 –989, 2004.

PARKINSON, D.; GRAY, T.R.G. & WILLIAMS, S.T. *Methods for studying the ecology of soil microorganisms*. Oxford, Adlard, 1971. 116p.

PINTO-JUNIOR, O.B.; SANCHES, L.; DALMOLIN, A.C.; NOGUEIRA, J. S. de. Efluxo de CO₂ do solo em floresta de transição Amazônia Cerrado e em área de pastagem. *Acta Amazonica*, v. 39, p. 813-822, 2009.

RÉGENT INSTRUMENTS INC. Programa Win Rhizo. Disponível em: <http://www.regentinstruments.com/>. Acesso em: 30 de novembro de 2012).

RUSSELLE, M.P.; ENTZ, M.H.; FRANZLUEBBERS, A.J. Reconsidering integrated crop-livestock systems in North America. **Agronomy Journal**, Madison, v. 99, p. 325-334, 2007.

SAMPAIO, D.B.; ARAÚJO, A.S.F.; SANTOS, V.B. Avaliação de indicadores biológicos de qualidade do solo sob sistemas de cultivo convencional e orgânico de frutas. **Ciência e Agrotecnologia**, n. 2, p. 353-359, 2008.

SAVIOZZI, A.; BUFALINO, P.; LEVI-MINZI, R.; RIFFALD, R. Biochemical activities in a degraded soil restored by two amendments: a laboratory study. **Biology & Fertility of Soils**, v. 35, p. 96-101, 2002.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. Biotecnologia do solo. MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, Brasília, p. 125-177, 1988.

SMITH, J.L.; PAUL, E.A. The significance of soil microbial biomass estimations. In: J.M. BOLLAG & G. STOTZKY. (Eds.). Soil Biochemistry. v. 6. Marcel Dekker, New York. 367p.

TEDESCO, M.J.; BOHNEM, H.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A. & VOLKWEISS, S.J. Análise de solo, plantas e outros materiais. 2.ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p. (Boletim Técnico, 5).

TÓTOLA, M.R. & CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ V.,V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARROS, N.F.; MELLO, J.W.V. & COSTA, L.M., eds. Tópicos em ciência do solo. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. v. 2. p. 195-276.

VICTÓRIA, R.L.; PICCOLO, M.C.; VARGAS, A.A.T. O ciclo do nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Ed.). Microbiologia do solo. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. cap.8, p. 105-119.

WHITEHEAD, D.C. The role of nitrogen in grassland productivity. **Bulletin 48 Common Wealth Bureau of Pastures and field Crops**, Berkshire, England, 1970.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados referentes a este estudo mostraram a importância da pesquisa na área de impacto ambiental dos fármacos veterinários. Rotineiramente estes fármacos são administrados aos animais, sem considerar sua capacidade de poluição ao ambiente. Este descaso pode ser atribuído, muitas vezes, à falta de informação sobre o real acúmulo, dano e dinâmica destas substâncias no solo, água e plantas, podendo acarretar em prejuízos a médio e longo prazo. A partir disso, para que os sistemas de produção animal sejam sustentáveis, todos os elos da cadeia produtiva devem se atentar aos prejuízos dos fármacos veterinários ao ambiente e buscar alternativas que minimizem este impacto.

Particularmente para a MOX, o tempo máximo de eliminação do fármaco foi às 70,79 horas após a aplicação cuja concentração foi de $21,52 \text{ ng.g}^{-1}$, com este conhecimento os profissionais podem propor manejo aos animais que permita diminuir a contaminação ambiental, como por exemplo, manter os animais que receberam o anti-helmíntico, confinados durante o pico de excreção, coletando as fezes para compostagem.

Os resultados referentes à persistência da MOX confirma a grande sorção da molécula nas fezes, verificou-se degradabilidade de apenas 37% até 88 dias, sendo que a chuva não aumentou este processo. No tratamento que não havia cobertura contra chuva houve aumento na concentração de MOX em relação à inicial, para todos os dias de coleta, com exceção do último dia, o que pode ser devido à perda de componentes solúveis das fezes como consequência da chuva. No presente estudo, isso pode ter ocorrido no período entre 12 e 36h. Após esse período a diminuição da concentração de MOX nas amostras sem cobertura poderá ser devida a degradação da molécula como consequência de fatores ambientais (ex. foto-oxidação). Desta forma, sugerem-se estudos que tenham como objetivo explicar a relação entre o aumento na concentração da molécula de moxidectina e a presença da chuva.

No ambiente, a MOX não apresentou efeitos negativos contra fauna coprófaga, o que revela que este fármaco é menos prejudicial ao ambiente. No Brasil, pesquisas de impacto ambiental para fármacos de uso em ovinos não são exigidos pelas agências reguladoras, o que deveria ser considerado quando são

introduzidos novos produtos. Adicionalmente, alternativas de controle da verminose, devem ser sempre desenvolvidas, com intuito de reduzir o controle químico, visto que o conhecimento dos efeitos da MOX no ambiente ainda é limitado.

A moxidectina favoreceu o processo de decomposição das fezes, sugere-se que este fármaco tenha atraído a fauna corprofaga. O entendimento desta dinâmica é limitado, sugere-se que esta substância por si só, possa atraí-los, ou proporcionar mudanças nos micro-organismos ruminais, conseqüentemente no metabolismo de nutrientes nos órgãos envolvidos na digestão e absorção de nutrientes. O maior número de indivíduos em contato com a molécula pode, também, aumentar seu poder contaminante.

Finalmente, poucas pesquisas têm sido realizadas com intuito de avaliar o efeito dos anti-helmínticos sobre a microbiologia do solo. Neste trabalho, os resultados demonstraram que a MOX reduziu a atividade microbiana do solo, desta forma, essa toxicidade deve ser considerada. Sugere-se que novas pesquisas que identifiquem os gêneros de fungos, bactérias e actinobactérias, que são potencialmente inibidos pela ação de anti-helmínticos, amplamente utilizados na produção animal, sejam realizadas visando o controle do impacto ambiental destes fármacos, questão importante para o desenvolvimento sustentável da produção animal.



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 055/2011, referente ao projeto “Resíduo de Moxidectina nos tecidos de cordeiros terminados em pasto submetidos a três programas de controle de endoparasitas e seu impacto no ambiente”, sob a responsabilidade de Alda Lucia Gomes Monteiro , na forma que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 16 de dezembro de 2011.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 055/2011, regarding the project “Moxidectin residue in tissues of lambs finishing on pasture in three endoparasites control programs and its impact on the environment”, in charge of Alda Lucia Gomes Monteiro , in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on December 2011.

Curitiba, 16 de dezembro de 2011.

Geraldo Camilo Alberton
Presidente

Patrick Schmidt
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná.