

ANÁLISE DOS EFEITOS DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO NA HISTOLOGIA DO INTESTINO DE *Eisenia andrei*

Francisco Almança Trujillo¹, Ludmila da Silva Figueira Barone², Tatiana da Silva Souza¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Bairro Alto Universitário – 29.500-000 – Alegre/ES, Brasil, francisco454748@gmail.com, tatianas.souza@hotmail.com

²Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca/FIOCRUZ, R. Leopoldo Bulhões, 1480 - 21041-210 – Rio de Janeiro/RJ, Brazil, ludmila.fbarone@gmail.com

Resumo

O presente estudo avaliou os efeitos do inseticida imidacloprido na histologia do intestino de *Eisenia andrei* (minhocas), um biodicador da qualidade do solo. As concentrações testadas foram 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 e 0.8 mg kg⁻¹. Os tecidos epitelial e cloragógeno foram examinados qualitativa e semiquantitativamente. As concentrações de 0.4, 0.6 e 0.8 mg kg⁻¹ aumentaram o índice de dano histopatológico em relação ao controle. As alterações observadas foram a degradação e o desprendimento de células epiteliais e das células cloragógenas. Conclui-se deste trabalho que, em maiores concentrações o imidacloprido é capaz de alterar e danificar o intestino o das minhocas, prejudicando assim sua estrutura corpórea e possivelmente afetando sua fisiologia.

Palavras-chave: Agrotóxicos. Concentrações subletais. Minhocas. Ecotoxicologia terrestre.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas – Biologia Geral

Introdução

O imidacloprido (1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ilideno amina) é um inseticida do grupo químico neonicotinoide, sistêmico, de contato e ingestão, amplamente utilizado em vários países do mundo contra insetos-praga que acometem mais de 40 culturas (Ibama, 2020). Apesar da eficiência no controle de insetos-praga, o imidacloprido é classificado pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (Ibama) como perigoso ao meio ambiente (Ibama, 2021), sobretudo por ser altamente tóxico para as abelhas, importantes polinizadores (Nicodemo et al., 2014; Li et al., 2017; Jiang et al., 2018); o que levou a União Europeia a proibir seu uso e comercialização (European Commission, 2018).

Esse estudo tem como foco os efeitos do imidacloprido em organismos edáficos, pois tem sido demonstrado que esse inseticida pode causar efeitos adversos para organismos não-alvo do solo de modo a afetar suas funções e serviços ecossistêmicos. Nesse sentido, diversos estudos têm apontado os efeitos do imidacloprido sobre o comportamento, reprodução e sobrevivência de minhocas (Alves et al., 2013; Wang et al., 2015; Silva et al., 2017; Wang et al., 2019), que constituem um dos principais representantes da macrofauna do solo.

Minhocas podem absorver contaminantes do solo via parede do corpo e ingestão. A identificação de alterações celulares e tissulares em órgãos-alvo podem prever mudanças fisiológicas, fornecendo informações de como o animal lida com situações de estresse ambiental (Wang et al., 2015; Babić et al., 2016a,b; Nusair et al., 2017; Rodriguez-Seijo et al., 2017; He et al., 2022; Yang et al., 2022).

O intestino é um tubo longo de tecido fino que é revestido internamente por uma camada ciliada dobrada, que forma vilosidades. Possui uma prega na região dorsal denominada tiflosole que aumenta a superfície de contato auxiliando na absorção. Todo o intestino é circulado por um tecido denominado cloragógeno, que exerce alta atividade metabólica, controle de substâncias e de fontes de energia (Vogel, Seifert, 1992; Ribeiro, 2016; Procházková et al., 2018).

O objetivo geral desse trabalho foi investigar a ação tóxica de uma formulação comercial de inseticida à base de imidacloprido sobre *Eisenia andrei*, de modo a responder se concentrações

subletais afetam a histologia do intestino desses organismos. O objetivo específico foi proceder uma análise semiquantitativa do intestino das minhocas expostas ao inseticida.

Metodologia

As minhocas utilizadas no ensaio são oriundas de um lote matriz de *E. andrei* adquirido da empresa Minhobox®, mantidas em cultura sincronizada, tendo esterco bovino como substrato. Os exemplares selecionados eram adultos com clitelo bem desenvolvido e com peso entre 300 e 600 mg.

Foi utilizada a formulação comercial Warrant® 700 WG, composta de 700 g/kg (70% m/m) de imidacloprido e de 300 g kg⁻¹ (30% m/m) de ingredientes inertes. A partir do produto comercial, uma solução estoque e soluções-teste foram preparadas, tendo água destilada como meio de diluição. As concentrações testadas foram expressas como mg i.a/kg de solo.

O solo utilizado no estudo é um solo natural, coletado a uma profundidade de 0-20 cm e peneirado em uma malha de 2 mm. A CRA do solo foi determinada conforme a norma NBR ISO 17512-1 e ajustada para 60%. O solo-controle foi umedecido apenas com água destilada e a contaminação do solo-teste foi realizada conforme Carniel e Segat (2018). As concentrações de imidacloprido testadas foram 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 e 0.8 mg kg⁻¹, selecionadas com base nos resultados do ensaio de toxicidade aguda realizado previamente por nosso grupo de pesquisa, considerando 14 dias de exposição (Barone, 2023).

As minhocas foram acondicionadas em recipientes de plástico transparente, com tampa perfurada, com 500 g de solo-teste ou solo-controle. Foram preparadas 4 réplicas por tratamento com 10 minhocas cada. Após, os recipientes foram pesados para o monitoramento e reposição semanal da umidade. Semanalmente foram inseridos em cada recipiente 5 g de esterco (seco) umedecido com 5 ml de água para a manutenção das taxas de crescimento. As minhocas ficaram expostas por 28 dias.

Logo após os 28 dias, as minhocas foram anestesiadas com etanol 7%, os clitelos foram seccionados, fixados em Bouin, desidratados em soluções crescentes de etanol, diafanizados em xilol I e xilol II, embebidos e emblocados em parafina por 4-6 horas em temperatura ambiente. Após essa etapa, os blocos foram armazenados na geladeira (Silva, 2022). O material foi cortado transversalmente em secções de 6 µm de espessura em micrótomo Leica RM20125RT, as secções foram coradas com hematoxilina e eosina segundo Junqueira e Junqueira (1983) e montadas em bálsamo do Canadá. O intestino das minhocas foi examinado em microscópio de luz Leica DM750 equipado com câmera digital Leica ICC50. Quatro (4) lâminas (4 minhocas) por tratamento foram examinadas.

A análise histopatológica do intestino das minhocas foi feita de forma semiquantitativa, analisando três estados em que o epitélio intestinal e o tecido cloragógeno poderiam se encontrar, baseado no trabalho de Dittbrenner et al. (2011). Os estados que foram utilizados foram: (1) Controle; (2) Estado de Reação e (3) Estado de Destruição. Na Tabela 1 estão as alterações classificadas de acordo com o seu estado.

Tabela 1 – Padrão de reações e sistema de pontuação para análise semiquantitativa das alterações histológicas:

	Status Controle (1)	Estado de Reação (2)	Estado de Destruição (3)
Epitélio Intestinal	Intestino preservado células epiteliais justapostas Tiflossole preservada	Formato irregular das células Superfície irregular Intestino maior que ¼ do corpo	Células desintegradas Tiflossole interrompida Epitélio interrompido/ruptura epitélio atrofiado
Tecido Cloragógeno	Tecido preservado junto ao intestino Tecido denso ininterrupto	Tecido inchado Células irregulares Superfície irregular	Tecido interrompido/ruptura Tecido atrofiado Células desintegradas Tecido inexistente

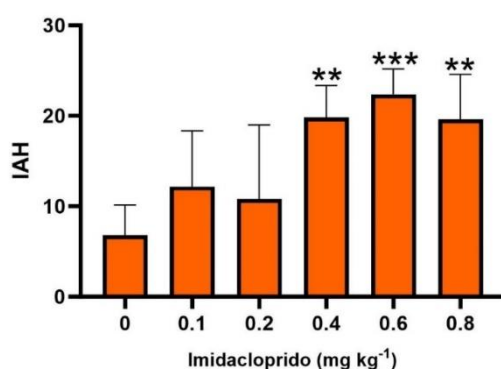
Fonte: Adaptado de Dittbrenner et al. (2011)

A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias mediante o teste de Brown-Forsythe. ANOVA foi aplicada seguida pelo teste de Dunnet. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 9.4, assumindo-se uma significância estatística de 5%.

Resultados

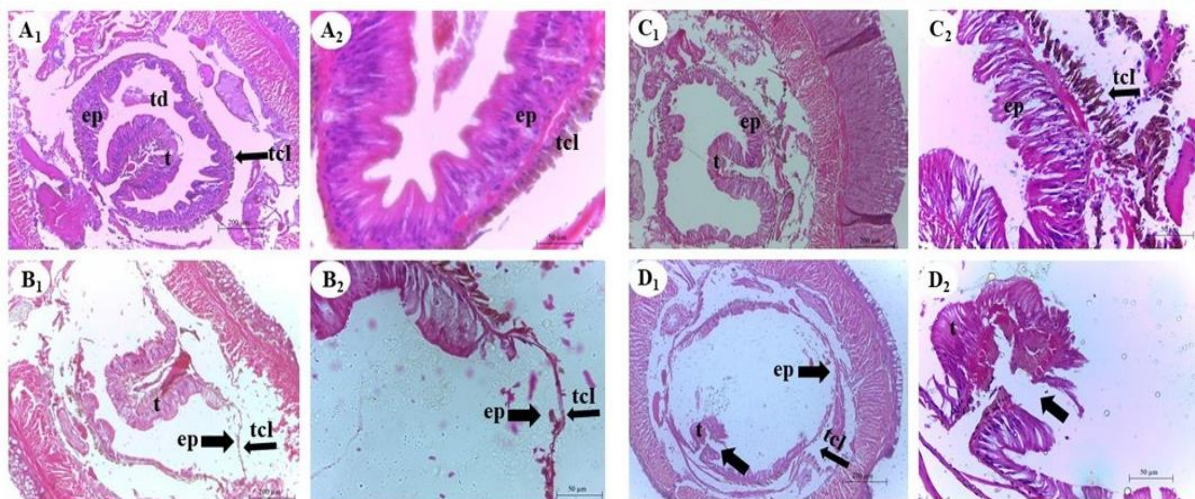
O resultado da análise semiquantitativa do intestino é apresentado na Figura 1. Houve maior taxa de alterações quando as minhocas foram expostas às concentrações de 0,4, 0,6 e 0,8 mg kg⁻¹ do imidacloprido em relação ao solo controle. As alterações registradas são apresentadas na Figura 2.

Figura 1 - Índice de alterações histopatológicas (IAH) do intestino de *E. andrei* após exposição a solo contaminado com diferentes concentrações de imidacloprido. Asteriscos (*) denotam diferença estatística em relação ao solo controle (0 mg kg⁻¹) por meio do teste de Dunnet (p<0,05).



Fonte: Autor

Figura 2 - Análise histopatológica do intestino de *E. andrei*. (A₁ – A₂) Secções transversais do intestino de minhoca do grupo controle. (B₁, C₁ e D₁). Secções de minhocas expostas à solo contaminado com, respectivamente, 0,4, 0,6 e 0,8 mg/kg de imidacloprido. As figuras B₂, C₂ e D₂ mostra detalhes das Figuras B₁, C₁ e D₁, respectivamente. As principais alterações observadas foram o desprendimento de células epiteliais e do tecido cloragógeno (B₁ – B₂), a degradação das células epiteliais e das células cloragógenas (C₂) e a ruptura do tiflosole (D₁ – D₂). ep = células epiteliais. tcl=tecido cloragógeno. td= lúmen do trato digestório. t= tiflosole.



Fonte: Autor

Discussão

A análise do intestino de minhocas expostas a solo contaminado tem sido muito utilizada para analisar as possíveis alterações que o agente tóxico pode fazer ao órgão. O epitélio intestinal responsável pela absorção e digestão, e o tecido cloragógeno responsável principalmente pela desintoxicação, são juntos da parede do corpo, órgãos que auxiliam no quesito adaptação das minhocas ao meio contaminado em que habitam.

O estudo realizado por Babić et al. (2016) mostrou que as minhocas podem sofrer mudanças progressivas, quando conseguem se adaptar ao meio em que se encontram, e mudanças regressivas, quando não conseguem se adaptar. Num estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, as mesmas concentrações de imidacloprido testadas aqui (0.1 – 0.8 mg kg⁻¹) causaram danos histopatológicos na parede do corpo de *E. andrei*, sendo que as concentrações de 0.6 e 0.8 mg kg⁻¹ foram as que induziram maior frequência de danos regressivos. Ainda a concentração de 0.8 mg kg⁻¹ reduziu significativamente a espessura da parede do corpo das minhocas, indicando que elas não foram capazes de se adaptar ao poluente.

Como a parede do corpo é a primeira barreira contra agentes tóxicos presentes no solo, a diminuição de tal barreira faz com que seja mais fácil para o agente tóxico chegar ao intestino, fazendo com que fique muito exposto. Além dessa via de exposição, o intestino das minhocas pode ter sido afetado por meio da ingestão direta de partículas sólidas contaminadas com imidacloprido.

O epitélio intestinal e o tecido cloragógeno expostos ao imidacloprido não foram capazes de resistir às maiores concentrações de imidacloprido, se encontrando em grande parte em estados de destruição (alteração regressiva), como é mostrado na Figura 2. Nossos dados corroboram o estudo feito por Sun et al. (2021) que mostraram que em minhocas da espécie *E. fetida*, quanto mais se aumentava as concentrações do poluente (pireno), mais o epitélio intestinal e o tecido cloragógeno iam sendo negativamente afetados. E como os estudos de Sun et al. (2021) e Dittbrenner et al. (2011) mostram, a alteração do intestino pode afetar de forma negativa a fisiologia das minhocas que estão expostas ao contaminante.

Conclusão

Conclui-se desta pesquisa que o imidacloprido se mostrou tóxico em doses subletais para as minhocas da espécie *E. andrei*, e a análise histológica semiquantitativa do intestino se mostrou eficiente para determinar a toxicidade do inseticida.

Referências

ALVES, P. R. L.; CARDOSO, E. J. B. N.; MARTINES, A. M.; SOUSA, J. P.; PASSINI, A. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions.

Chemosphere, v. 90, n. 11, p. 2674-2682, 2013.

BABIĆ, S; BARIŠĆ, J.; BIELEN, A.; BOŠNJAK, I.; KLOBUČAR, R. S.; UJEVIĆ, I.; STRUNJAK-PEROVIĆ, I.; POPOVIĆ, N. T.; ČOŽ-RAKOVAC, R. Multilevel ecotoxicity assessment of environmentally relevant bisphenol A concentrations using the soil invertebrate *Eisenia fetida*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 318, p. 477-486. 2016a.

BABIĆ, S; BARIŠĆ, J.; MALEV, O.; KLOBUČAR, G.; POPOVIĆ, N. T.; STRUNJAK-PEROVIĆ, I.; KRASNIĆ, N.; ČOŽ-RAKOVAC, R.; KLOBUČAR, R. S. Sewage sludge toxicity assessment using earthworm *Eisenia fetida*: can biochemical and histopathological analysis provide fast and accurate insight? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 12150-12163, 2016b.

BARONE, L. S. F. **Ecotoxicidade de um inseticida à base de imidacloprido: impacto na biota terrestre**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas Licenciatura). Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2023.

CARNIEL, L.S.C.; SEGAT, J.C. Aplicação da substância teste: agrotóxicos e matrizes orgânicas. In: OLIVEIRA FILHO, L.C.I.; SEGAT, J.C.; BARETTA, D.; KLAUBERG FILHO, O. (Eds.) **Ecotoxicologia terrestre: métodos e aplicações de ensaios com collembola e isopoda**. Florianópolis: UDESC, 2018. 200p.

DITTBRENNER, Nils et al. Sensitivity of *Eisenia fetida* in comparison to *Aporrectodea caliginosa* and *Lumbricus terrestris* after imidacloprid exposure. Body mass change and histopathology. **Journal of Soils and Sediments**, v. 11, p. 1000-1010, 2011.

EUROPEAN COMMISSION, 2018. Commission Implementing Regulation (EU) 2018/783 of 29 May 2018 amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active substance imidacloprid.

HE, F.; YU, H.; SHI, H.; LI, X.; CHU, S.; HUO, C.; LIU, R. Behavioral, histopathological, genetic, and organism-wide responses to phenanthrene-induced oxidative stress in *Eisenia fetida* earthworms in natural soil microcosms. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, p. 40012–40028, 2022.

IBAMA. Reavaliação ambiental do neonicotinóide imidacloprido - Comunicado nº 9630881, de 31 de março de 2021. Instituto Brasileiro De Recursos Naturais Renováveis - Ibama, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/aceso-a-informacao/publicacoes-oficiais/reavaliacao-ambiental-doneonicotinoide-imidacloprid>. Acesso em 15 de Fevereiro de 2024.

IBAMA. Relatórios de comercialização de agrotóxicos - Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil. Instituto Brasileiro De Recursos Naturais Renováveis - Ibama, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em 15 de Janeiro de 2024.

JIANG, J.; MA, D.; ZOU, N.; YU, X.; ZHANG, Z.; LIU, F.; MU, W. Concentrations of imidacloprid and thiamethoxam in pollen, nectar and leaves from seed-dressed cotton crops and their potential risk to honeybees (*Apis mellifera* L.). **Chemosphere**, v. 201, p. 159–167, 201.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Editora Santos, 1983. p. 48-81.

LI, H.; TAN, J.; SONG, X.; WU, F.; TANG, M.; HU, Q.; ZHENG, H.; HU, F. Sublethal doses of neonicotinoid imidacloprid can interact with honeybee chemosensory protein 1 (CSP1) and inhibit its function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 486, p. 391–397, 2017

NICODEMO, D.; MAIOLI, M.A.; MEDEIROS, H.C.D.; GUELFI, M.; BALIEIRA, K.V.B.; JONG, D. MINGATTO, F.E. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, p. 2070–2075, 2014.

NUSAIR, S.D.; ZAROOUR, Y. SA'ID A.; ALTARIFI, A.A. Effects of dibenzo-p-dioxins/dibenzofurans on acetylcholinesterase activity and histopathology of the body wall of earthworm *Eisenia andrei*: a potential biomarker for ecotoxicity monitoring. **Water Air Soil Pollution**, 228:266, 2017.

PROCHÁZKOVÁ, Petra et al. Contribution of *Eisenia andrei* earthworms in pathogen reduction during vermicomposting. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 26267-26278, 2018.

RIBEIRO, Louise Vargas. Contribuição ao estudo do extrato pirolenhoso no ambiente: ecotoxicologia, histopatologia e análise de parâmetros espermáticos em *Eisenia andrei*. 2016.

RODRIGUEZ-SEIJO, A.; LOURENÇO, J.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; COSTA, J. DA; DUARTE, A.

C.; VALA, H.; PEREIRA, R. Histopathological and molecular effects of microplastics in *Eisenia andrei* Bouche. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 495-503, 2017

SILVA, C. L.; BRENNAN, N.; BROUWER, J. M.; COMMANDEUR, D.; VERWEIJ, R. A.; van GESTEL, C. A. M. Comparative toxicity of imidacloprid and thiacloprid to different species of soil invertebrates. **Ecotoxicology**, v. 26, n. 4, p. 555-564, 2017.

SILVA, F. A. **ecotoxicidade dos pesticidas iprodiona e 2,4-D em *Eisenia andrei* (Oligochaeta)**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado). Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2022.

SUN, Ning et al. Probing the biological toxicity of pyrene to the earthworm *Eisenia fetida* and the toxicity pathways of oxidative damage: A systematic study at the animal and molecular levels. **Environmental Pollution**, v. 289, p. 117936, 2021.

VOGEL, Jürgen; SEIFERT, Gerhard. Histological changes in the chloragogen tissue of the earthworm *Eisenia fetida* after administration of sublethal concentrations of different fluorides. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, n. 2, p. 192-196, 1992.

WANG, K.; PANG, S.; MU, X.; QI, S.; LI, D.; CUI, F.; WANG, C. Biological response of earthworm, *Eisenia fetida*, to five neonicotinoid insecticides. **Chemosphere**, v. 132, p. 120-126, 2015.

WANG, X.; ZHU, X.; PENG, Q.; WANG, Y.; GE, J.; YANG, G.; WANG, X.; CAI, L.; SHEN, W. Multi-level ecotoxicological effects of imidacloprid on earthworm (*Eisenia fetida*). **Chemosphere**, v. 219, p. 923-932, 2019.

YANG, X.; SHANG, G.; WANG, X. Biochemical, transcriptomic, gut microbiome responses and defense mechanisms of the earthworm *Eisenia fetida* to salt stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 239 113684, 2022.

Agradecimentos

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Espírito Santo (PIBIC/UFES) pela bolsa concedida.