

# **Alterações histológicas em *Eisenia fetida* associadas à exposição a agroquímicos presentes nas pastagens da ilha de São Miguel**

Dissertação de Mestrado

Verónica Rodrigues Silva

Mestrado em

**Ciências Biomédicas**



Ponta Delgada  
2019



# **Alterações histológicas em *Eisenia fetida* associadas à exposição a agroquímicos presentes nas pastagens da ilha de São Miguel**

Dissertação de Mestrado

Verónica Rodrigues Silva

## **Orientadores**

Professor Doutor Armindo dos Santos Rodrigues  
Professora Doutora Patrícia Ventura Garcia  
Doutora Carolina Paula Furtado de Medeiros Parelho

Dissertação de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas



*“Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.*

*Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.*

*Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.”*

*Ricardo Reis, in "Odes"  
Heterónimo de Fernando Pessoa*

## Agradecimentos

Com a conclusão de uma nova etapa, gostaria de expressar o meu reconhecimento e agradecimento:

- Aos meus orientadores Professora Doutora Patrícia Garcia e Professor Doutor Armindo Rodrigues, por terem aceite orientar este projeto de Mestrado e por terem confiado nas minhas capacidades para o executar. E principalmente à minha orientadora Doutora Carolina Parelho, que sempre me apoiou desde o primeiro dia, e que sempre se disponibilizou a ajudar e acima de tudo pelo carinho e amizade que daqui se desenvolveu.

- Ao Mestre Ricardo Camarinho, por me auxiliar no meu trabalho laboratorial e pelos momentos de conversa e descontração. Ao Paulo Melo, que colaborou na execução dos cortes das minhocas, sem ele o rigor do meu trabalho não teria sido o mesmo.

- À minha colega de laboratório, Cristina Borges, pela simpatia, paciência para ouvir as minhas correções em voz alta, pelos risos sem propósito, e por todo apoio ao longo do ano.

- À Filipa Medeiros, que mais do que colega neste percurso universitário, é uma amiga que levo para a vida, e que sempre me apoiou na elaboração deste trabalho, desde as traduções do inglês, das dúvidas estatísticas, até mesmo às dúvidas existenciais. Foste de facto um importante e forte apoio. Que o futuro nos reserve bons sucessos.

E como não poderia deixar de ser, mesmo não sendo parte integrante desta família académica,

- Ao meu namorado, Bruno Medeiros, por ter sempre acreditado em mim, por ter feito tudo o que estava ao seu alcance para que este mestrado se realizasse, pela paciência que teve sempre que tinha que colocar o trabalho em primeiro lugar, pelas opiniões que lhe pedia, pelo carinho e amor. Estiveste sempre lá. Obrigada por nunca me deixares desistir.

## Resumo ilustrativo



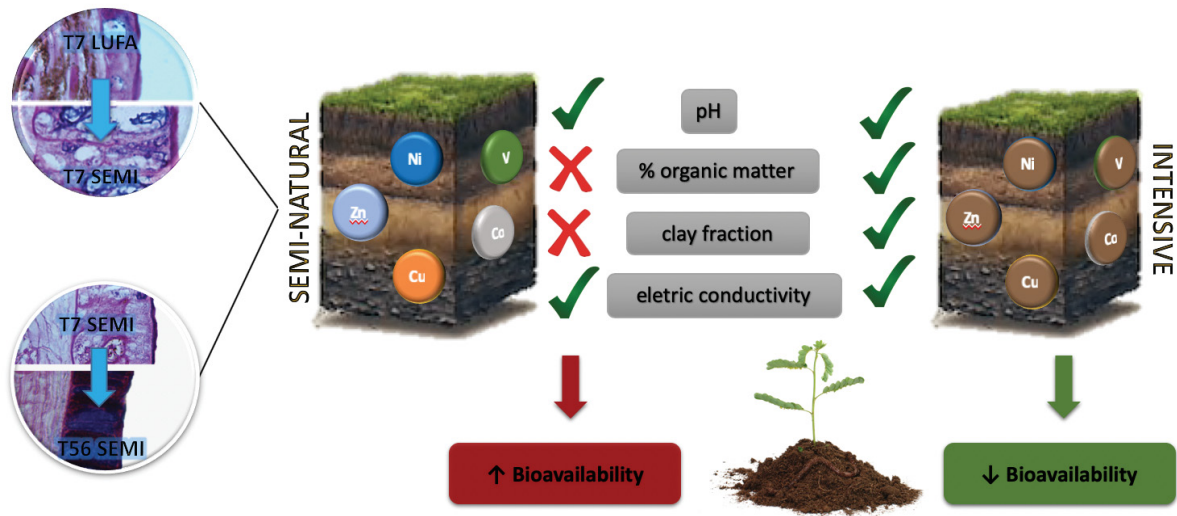
## Resumo

Os solos da ilha de São Miguel são enriquecidos naturalmente em metais, devido à sua herança vulcânica. Nesta ilha, as pastagens são sujeitas a diferentes tipos de manuseio agrícola, nomeadamente no que respeita à aplicação de agroquímicos, afetando a qualidade dos solos e dos organismos residentes, como é o caso dos anelídeos terrestres (minhocas). As minhocas são organismos edáficos e por isso importantes bioindicadores da qualidade dos solos. O principal objetivo deste trabalho foi estudar as alterações histológicas em minhocas da espécie *Eisenia fetida* (Saying, 1989), expostas a solos de pastagens sujeitas a diferentes tipos de manuseio agrícola, usando dois períodos de exposição, contribuindo assim para a biomonitorização dos efeitos ecotoxicológicos nos organismos do solo. Uma cultura sincronizada de *Eisenia fetida* foi monitorizada no final de dois períodos de exposição (7 e 56 dias) a solos provenientes de pastagens com diferentes tipos de manuseio agrícola (semi-natural, permanente e intensivo). Foram medidas as espessuras do epitélio e cutícula, e analisada a atividade secretora do epitélio tegumentar através da coloração PAS-AB. Os resultados mostraram que na exposição de curta duração, a espessura do epitélio e cutícula aumentaram significativamente nas minhocas expostas ao solo semi-natural. Por sua vez, uma exposição de longa duração resultou num aumento significativo da secreção de mucopolissacáridos (AB-positivo) nas minhocas expostas ao solo semi-natural. A utilização

destes biomarcadores permitiu avaliar respostas estruturais e funcionais destes organismos face à exposição ao solo de diferentes tipos de pastagem. O solo proveniente da pastagem com maior manuseio agrícola (maior exposição a agroquímicos) demonstrou ser menos prejudicial para *E. fetida* do que o solo da pastagem semi-natural. Provavelmente isto deve-se ao facto de, apesar de existirem PTEs no primeiro, as propriedades físico-químicas do solo da pastagem intensiva contribuíram para a retenção dos elementos, alguns deles metais pesados, diminuindo assim a sua biodisponibilidade. Este trabalho permitiu avaliar o risco da biodisponibilidade de PTEs existentes nos solos de pastagens vulcânicas, contribuindo para o desenvolvimento de medidas mitigadoras de efeitos ecotoxicológicos em níveis biológicos superiores, nomeadamente, eventuais efeitos na saúde humana.

**Palavras – chave:** Agroecossistemas; biodisponibilidade; *Eisenia fetida*; histologia; metais; minhocas; solos.

## Graphical-abstract



## Abstract

The soils of the São Miguel Island are naturally enriched with metals due to their volcanic heritage. In this island, pastures are subjected to different types of agricultural handling, especially to agrochemical applications, which affect the quality of soils and resident organisms, such as earthworms. Earthworms are edaphic organisms and therefore important bioindicators of soil quality. In this study, the main objective was to study the histological alterations in the earthworm *Eisenia fetida* (Saying, 1989) exposed to soil from pastures with distinct agricultural management, using two exposure periods, contributing to the development of biomarkers to biomonitor the ecotoxicological effects of agricultural management on soil organisms. A synchronized set of individuals of *Eisenia fetida* was monitored at the end of 7 and 56 days of exposure to soil from different pasture types (semi-natural, permanent and intensive management types). Epidermis and cuticle thicknesses were measured and secretory activity was analyzed by PAS-AB staining. After the short-term exposure (7 days) to the semi-natural soil, results showed that the thickness of the epithelia and cuticle increased significantly. Upon long-term exposure (56 days), the parameter mucopolysaccharide secretion (AB-positive), was statistically different in semi-natural soil. The use of these biomarkers allowed to evaluate the structural and functional responses of earthworms, after exposure to soils from pastures subjected to different agricultural

management. This study reveals that, the soil with higher agricultural management (higher exposure to agrochemicals) despite being contaminated with PTEs, is less harmful than the soil from the semi-natural pasture. The physico-chemical properties of the former favour the retention of these metals, decreasing their bioavailability to soil organisms. This work allowed to evaluate the risk of of the analysed PTEs bioavailability in volcanic pasture soils, contributing to the development of mitigation measures of the potential ecotoxicological effects at higher biological levels, namely those regarding human health .

**Keywords:** Agroecosystems; bioavailability; earthworms; *Eisenia fetida*; histology; metals; soils.

# Índice

Índice de Figuras .....	11
Índice de Tabelas .....	13
Lista de Abreviaturas .....	14
1. Enquadramento e pertinência do trabalho .....	15
2. Introdução.....	19
3. Metodologia.....	24
3.1 Solos (Recolha, propriedades físico-químicas e concentração de elementos potencialmente tóxicos [PTEs]).....	24
3.2 Organismo de estudo .....	24
3.3 Exposição Laboratorial .....	25
3.4 Processamento Histológico .....	26
3.5 Análise Histomorfométrica.....	27
3.6 Análise Estatística.....	28
4. Resultados.....	29
4.1 Análise dos Solos Experimentais .....	29
4.2 Análise dos Biomarcadores .....	30
4.2.1 Espessura do Epitélio.....	30
4.2.2 Espessura da Cutícula.....	31
4.2.3 Secreção de origem colagénica (PAS-positivo).....	33
4.2.4 Secreção de mucopolissacáridos ácidos (AB-positivo).....	35
5. Discussão.....	38
6. Conclusões .....	43
7. Referências Bibliográficas .....	44
8. Anexos.....	48
Anexo 1 - Preparação dos reagentes Ácido Periódico-Schiff (Bancroft, 2006).....	48

## Índice de Figuras

**Figura 1:** Localização geográfica da origem dos solos recolhidos para este trabalho (Unidade Geológica “Vulcão do Fogo”). Os triângulos representam o local de recolha dos solos: a vermelho, solo da pastagem semi-natural (Solo SEMI) (37°76'23.2"N, -25°49'42.3"E), a azul, solo da pastagem permanente (Solo EXT) (37°76'79.1"N, -25°43'52.0"E) e a verde, solo da pastagem intensiva (Solo INT) (37°76'70.5"N, -25°43'25.4"E). **17**

**Figura 2: a)** Morfologia externa de uma minhoca pertencente à classe *Clitellata*. **b)** Secção transversal diagramática de *Eisenia fetida*: **C+E** - cutícula e epiderme; **MC** - músculo circular; **ML** - músculo longitudinal; **VD** - vaso dorsal; **VV** - vaso ventral; **T** - tiflosole; **I** - cavidade intestinal; **EI** - epitélio intestinal; **N** - nefrídeo; **CNV** - cordão nervoso central. **20**

**Figura 3:** Esquema representativo do procedimento experimental: Numa primeira fase, as minhocas foram aclimatadas no solo LUFA durante uma semana. De seguida, as minhocas foram distribuídas aleatoriamente em caixas por tempos de exposição e por diferentes tipos de solo experimental. A letra “n” corresponde ao número de minhocas utilizado para análise histomorfométrica e quantificação de PTEs. **26**

**Figura 4: 1A.** Esquema de um modelo de minhoca em corte transversal. Medições efetuadas em A e D correspondem à região dorsal, e em B e C correspondem à região ventral. **1B.** Exemplificação da medição de espessura do epitélio (**I**) e cutícula (**II**) num corte transversal de *Eisenia fetida*. **27**

**Figura 5:** Espessura (média ± EP) do epitélio de *E. fetida* no início do ensaio (controlo T0 LUFA – barra verde) e após exposição durante 7 dias (barras a laranja) a diferentes tipos de solo. Para cada barra, letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre grupos estudados (Teste de Tukey,  $P < 0.05$ ). **30**

**Figura 6:** Espessura (média ± EP) do epitélio de *E. fetida* para cada tipo de solo no início do ensaio (controlo T0 LUFA – barra verde), e ao fim da exposição de  $t = 7$  (barras a laranja) e  $t = 56$  dias (barras a azul). Para cada tipo de solo, as diferentes letras entre barras representam as diferenças significativas entre os tempos de exposição (Teste-t,  $P < 0.05$ ). **31**

**Figura 7:** Espessura (média ± EP) da cutícula de *E. fetida* no início do ensaio (controlo T0 LUFA – barra verde) e após exposição durante 7 dias (barras a laranja) a diferentes tipos de solo. Para cada barra, letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre grupos estudados (Teste de Tukey,  $P < 0.05$ ). **32**

**Figura 8:** Espessura (média ± EP) da cutícula de *E. fetida* para cada tipo de solo no início do ensaio (controlo T0 LUFA – barra verde), e ao fim da exposição de  $t = 7$  (barras a laranja) e **33**

t = 56 dias (barras a azul). Para cada tipo de solo, as diferentes letras entre barras representam as diferenças significativas entre os tempos de exposição (Teste-t,  $P < 0.05$ ).

**Figura 9:** Distribuição de frequências absolutas de cada classificação atribuída ao tipo de secreção PAS-positivo do epitélio de *E. fetida* nos diferentes tipos de grupos de estudo. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre grupos estudados (Teste de Mann Whitney,  $P < 0.05$ ).

34

**Figura 10:** Proporções (%) do tipo de secreção PAS-positivo do epitélio de *E. fetida* nos diferentes grupos de estudo. Na tabela, estão apresentadas as percentagens relativas de cada classificação atribuída ao tipo de secreção PAS-positivo, para cada grupo estudado. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas na proporção de cada classificação entre os grupos estudados (Teste de Qui-Quadrado,  $P < 0.05$ ).

35

**Figura 11:** Distribuição de frequências absolutas de cada classificação atribuída ao tipo de secreção AB-positivo do epitélio de *E. fetida* nos diferentes tipos de grupos de estudo. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre grupos estudados (Teste de Mann Whitney,  $P < 0.05$ ).

36

**Figura 12:** Proporções (%) do tipo de secreção AB-positivo do epitélio de *E. fetida* nos diferentes tipos de grupos de estudo. Na tabela, estão apresentadas as percentagens relativas de cada classificação atribuída ao tipo de secreção azul, para cada tipo de grupo estudado. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas na proporção de cada classificação entre os grupos estudados (Teste de Qui-Quadrado,  $P < 0.05$ ).

37

**Figura 13:** Diagrama explicativo das condições necessárias (características físico-químicas do solo) à biodisponibilidade dos metais pesados para os organismos do solo e plantas.

41

**Figura 14:** Fluxograma indicativo das respostas estruturais resultantes do aumento da espessura da epiderme.

42

**Figura 15:** Filtração do Azul de Alcian com filtro de pregas.

48

**Figura 16:** Procedimento da Coloração.

48

## Índice de Tabelas

**Tabela 1:** Categorias atribuídas (0 a 4) às proporções (0 – 100%) de cada tipo de secreção: PAS-positivo (magenta) e AB-positivo (azul). **28**

**Tabela 2:** Média ( $\pm$  DP) da concentração de PTEs ( $\text{mg.kg}^{-1}$ , d.w.) em amostras dos solos experimentais: semi-natural (SEMI), permanente (EXT) e intensivo (INT). Valores médios ( $\pm$  DP) das propriedades físico-químicas dos solos: LUFA (Speyer), SEMI, EXT e INT. **29**

## Lista de Abreviaturas

**CaCO<sub>3</sub>**: carbonato de cálcio

**CO<sub>2</sub>**: dióxido de carbono

**EXT**: permanente

**hD**: horas de escuridão, do inglês “darkness hours”

**hL**: horas de iluminação, do inglês “lighting hours”

**LUFA**: solo natural não contaminado

**ICP/OES**: Espectrofotometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente

**INT**: intensivo

**IPS/MS**: Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente

**PAS-AB**: Ácido Periódico-Schiff – Azul de Alcian, do inglês “Periodic Acid-Schiff – Alcian Blue”

**PTEs**: elementos potencialmente tóxicos, do inglês “potentially toxic elements”

**SEMI**: semi-natural

# 1. Enquadramento e pertinência do trabalho

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto BIOINVENT - *Generic bio-inventory of functional soil microbial diversity in permanent grassland ecosystems across management and climate gradients* (M1.1.C/2/001/2017), um projeto Europeu aprovado no seguimento da *BiodivERsA COFUND Call 2015-2016* (Tema#1: *Understanding and managing the biodiversity dynamics of soils and sediments to improve ecosystem functioning and delivery of ecosystem services*). Por sua vez, *BiodivERsA - the network programming and funding research on biodiversity and ecosystem services across European countries and territories*, constitui uma ERA-NET co-financiada no âmbito do programa-quadro de investigação e inovação da União Europeia – HORIZON 2020.

O BIOINVENT é um estudo pan-Europeu (desde os Açores até ao norte da Suécia), que pretende gerar entendimento fundamental sobre a biodiversidade microbiana do solo em diferentes sistemas de pastagens e seu potencial funcional, ao longo de um gradiente de manuseio agrícola e de fatores agroecológicos, por toda a Europa. O conhecimento gerado permitirá desenvolver uma nova e genérica “caixa de ferramentas” ('BIOINVENT') para a monitoração da diversidade microbiana do solo e suas propriedades funcionais, tais como as funções de “provisão”, “suporte” e “regulação” em ecossistemas de pastagem na Europa, em várias escalas espaciais.

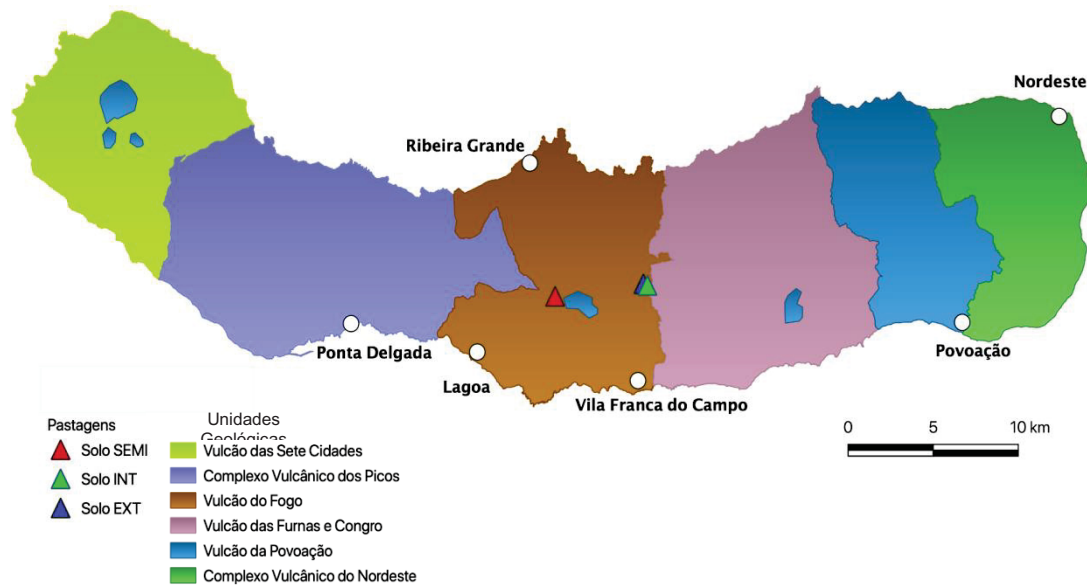
O solo tem um efeito considerável na saúde ambiental e humana. Este é considerado uma fonte importante de nutrientes no suprimento de alimentos e medicamentos, como os antibióticos (Datta *et al.*, 2016; Steffan *et. al*, 2018). No entanto, pode ser contaminado de forma natural ou através da atividade antropogénica com elementos químicos e substâncias nocivas, que em concentrações tóxicas podem causar efeitos negativos na comunidade biológica do solo e na saúde humana. Por exemplo, as pessoas cuja profissão está diretamente relacionada com o solo, como agricultores, trabalhadores de construção civil ou mineiros têm maior risco de desenvolver problemas de saúde por via respiratória ou absorção cutânea (Farshadirad *et al.*, 2019; Steffan *et. al*, 2018).

Ao longo das últimas décadas, o significado para os termos “qualidade” e “saúde” dos solos tem vindo a ser discutido, uma vez que primeiramente este conceito era visto como o estado do solo em relação à produtividade e fertilidade agrícola. Mais tarde, em 1994, Doran e Parkin, não só consideraram que a qualidade dos solos estava relacionada com a sua

produtividade, como também era importante atentar nas interações dos solos com o meio ambiente, incluindo as implicações para a saúde humana e animal.

Deste modo, este trabalho enquadra-se no âmbito do projeto BIOINVENT, pois pretendeu estudar os efeitos ecotoxicológicos dos diferentes tipos de manuseio agrícola das pastagens num organismo do solo, *E. fetida*. Os resultados obtidos contribuirão para o desenvolvimento de medidas que promovam a saúde ambiental e humana, nomeadamente através de uma produção sustentável e de melhor qualidade de alimentos para os humanos.

Neste trabalho foram utilizados solos de pastagens da ilha de São Miguel (Açores) como base de estudo. Devido à sua herança vulcânica, estes solos são enriquecidos naturalmente com uma enorme variedade de elementos químicos vestigiais, que conferem propriedades adequadas à produção agrícola, como a elevada capacidade para retenção de água e o alto teor de carbono orgânico (Pacheco *et al.*, 2013). No entanto, considerando o contexto geológico da ilha de São Miguel, e tratando-se de uma ilha vulcânica, onde as idades das unidades geológicas podem ser muito diferentes dentro da própria ilha, há uma maior dificuldade na comparação entre sistemas agrícolas localizados em diferentes unidades geológicas. Desta forma, os solos das pastagens em estudo devem estar localizados dentro da mesma unidade geológica, para uma avaliação correta da “saúde” do solo, garantindo assim as mesmas condições geológicas, diferenciando-se apenas o tipo de manuseio agrícola da pastagem (Parelho C., 2016). Neste trabalho, foram utilizados solos de pastagens da unidade geológica Vulcão do Fogo, como demonstrado na Figura 1.



**Figura 1:** Localização geográfica da origem dos solos recolhidos para este trabalho (Unidade Geológica “Vulcão do Fogo”). Os triângulos representam o local de recolha dos solos: a vermelho, solo da pastagem semi-natural (Solo SEMI) (37°76'23.2"N, - 25°49'42.3"E), a azul, solo da pastagem permanente (Solo EXT) (37°76'79.1"N, - 25°43'52.0"E) e a verde, solo da pastagem intensiva (Solo INT) (37°76'70.5"N, - 25°43'25.4"E).

Sendo a ilha de São Miguel a maior ilha do arquipélago dos Açores, e com maior densidade populacional, contribui com maior sustento de produção de alimentos e produtos lácteos, correspondendo a área de pastagem a 61% da área da ilha (Cruz *et al.*, 2007; Parelho C., 2016). Para além disso, estas pastagens são maioritariamente utilizadas para explorações leiteiras, e a produção de leite resultante das explorações açorianas contribui com cerca de 32% para a produção nacional (INE, 2018).

Pelo exposto, é nesta ilha onde se esperam os maiores distúrbios antropogénicos no solo, como a aplicação de agroquímicos resultantes dos diferentes tipos de manuseio agrícola das pastagens. A aplicação de agroquímicos nos solos, como fertilizantes e pesticidas, são uma ferramenta útil aos agricultores na prevenção e correção de alguns danos nas suas produções agrícolas e a respetiva otimização. No entanto, estes produtos apresentam na sua composição, entre outros contaminantes, metais, tais como cádmio e chumbo, que direta ou indiretamente afetam a saúde ambiental e humana (Costa *et al.*, 2008). Estes elementos,

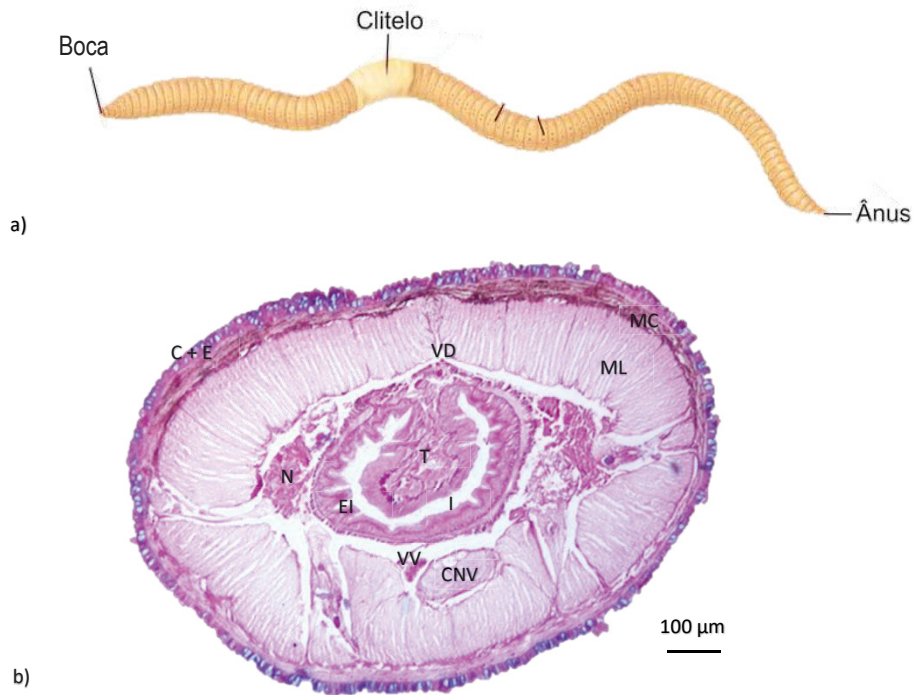
por vezes em concentrações tóxicas, depositam-se nos solos, podendo afetar diretamente os organismos lá existentes e os serviços ecossistémicos providos, incluindo a qualidade dos alimentos produzidos nestes solos. Desta forma, é essencial o estudo da qualidade dos solos das pastagens açorianas, sabendo que existem diferentes tipos de manuseio agrícola, que definem as pastagens como semi-naturais, permanentes e intensivas.

Deste modo, é importante avaliar a pegada metálica e ecológica em pastagens sujeitas a diferentes tipos de manuseio agrícola, por forma implementar medidas de gestão agrícola ajustadas, que permitam a manutenção do bom estado ambiental do ecossistema agrícola em geral, assim como do solo e dos organismos residentes, em particular. Um solo saudável é o pilar para a produção de alimentos de qualidade (não contaminados por PTEs), permitindo salvaguardar a saúde humana e ambiental.

## 2. Introdução

As minhocas são invertebrados ectotérmicos pertencentes à classe *Clitellata*, caracterizados por possuírem clitelo, estrutura reprodutiva deste tipo de anelídeos (Briones *et al.*, 2018) (Figura 2). Uma das principais características destes organismos é a segmentação externa e interna, distintiva do filo *Annelida*. A divisão ao longo do corpo é marcada por septos transversais que separam o celoma em cavidades (Edwards & Bohlen, 1996; Roubalová *et al.*, 2015). O celoma estende-se por todo o comprimento do corpo da minhoca e é preenchido pelo fluido celómico, que ajuda na contração do tecido muscular (circular e longitudinal), e por sua vez na sua movimentação (Edwards & Bohlen, 1996; Kılıç *et al.*, 2011). Em cada segmento, observam-se cerdas laterais quitinosas que aumentam a tração ao substrato. O primeiro segmento corresponde à boca da minhoca, enquanto que o ânus pertence ao último segmento (Figura 2). Estes organismos possuem um sistema vascular fechado com vaso dorsal e ventral, e um cordão nervoso ventral. No que diz respeito à reprodução, estes organismos são hermafroditas, e a sua estrutura reprodutiva é apenas definida quando atingem a maturidade, designada de clitelo (Morris *et al.*, 1985; Sharma *et al.*, 2005; Sivakumar *et al.*, 2015). Quanto ao sistema digestivo, as minhocas alimentam-se essencialmente de matéria orgânica e possuem um sistema digestivo relativamente simples constituído por: boca, faringe, esófago, moela, papo e intestino (Edwards & Bohlen, 1996; Sharma *et al.*, 2005). Uma característica importante do intestino é a presença de glândulas calcíferas no esófago, que secretam carbonato de cálcio para o interior do intestino, não para serem reabsorvidos, mas atuando de forma alternativa a eliminar o CO<sub>2</sub> proveniente da respiração cuticular. A parte superior dorsal do lúmen intestinal, na qual se encontra uma crista ou dobra, é designada por tiflossolo, cuja função é aumentar a superfície de absorção intestinal (Edwards & Bohlen, 1996) (Figura 2).

O tegumento das minhocas é constituído pela epiderme, que consiste numa única camada epitelial ou pseudoestratificada, que varia entre 50 a 70 µm de espessura, e por uma cutícula fibrosa suprajacente. Subjacentes à epiderme encontram-se os tecidos conjuntivo e muscular que formam a maior parte da parede do corpo da minhoca (Coggeshall *et al.*, 1966; Licata *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2011) (Figura 2).



**Figura 2:** a) Morfologia externa de uma minhoca pertencente à classe *Clitellata*. b) Secção transversal diagramática de *Eisenia fetida*: **C+E** - cutícula e epiderme; **MC** - músculo circular; **ML** - músculo longitudinal; **VD** - vaso dorsal; **VV** - vaso ventral; **T** - tiflosole; **I** - cavidade intestinal; **EI** - epitélio intestinal; **N** - nefrídeo; **CNV** - cordão nervoso central.

No que diz respeito ao epitélio epidérmico, este é constituído por células de suporte (colunares), células basais (confinadas às regiões basais) e por dois tipos de células caliciformes secretoras de muco: células ortocromáticas e células metacromáticas (Coggeshall *et al.*, 1966; Licata *et al.*, 2000; Licata *et al.*, 2002; Cunha *et al.*, 2011; Briones *et al.*, 2018). Também, segundo alguns autores, é possível encontrar células sensoriais, células especializadas semelhantes a células neuroendócrinas, com funções não só secretoras mas também recetoras de estímulos. O controlo deste tipo de secreção é modulado por substâncias bioativas, como a serotonina, endotelina e a enolase específica de neurónios (encontradas nas células epidérmicas de *Lumbricus terrestris*), uma vez que as células glandulares não estão associadas a terminações nervosas (Licata, *et al.*, 2000, 2002; Mastrodonato *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015).

No que diz respeito à secreção mucosa, as células secretoras podem ser classificadas como: células ortocromáticas – complexo de mucopolissacáridos, proteínas e lípidos neutros (definidas como tipo I), e células metacromáticas – secretam mucinas carboxiladas, levemente sulfatas (definidas como tipo II, III e IV). As células ortocromáticas ou células do tipo I, são pequenas células com secreções proteicas granulosas, que se estendem a toda a altura do epitélio, homoganeamente coradas de azul com a utilização de azul de toluidina. As células metacromáticas ou do tipo II, são células com secreções granulares finas, restritas à região dorsal do indivíduo, com intensa metacromasia roxa. As células do tipo III apresentam metracromasia rosa intenso, com grânulos bem definidos. Este tipo de células secretam mucosubstâncias ácidas, resultante da mistura de grânulos sulfatados com não sulfatados. As células do tipo IV situam-se na região ventrolateral e ventral do organismo, e são coradas de rosa claro correspondente a substâncias mucosas do tipo sulfatada (Morris *et al.*, 1985; Mastrodonato *et al.*, 2005).

De uma forma generalizada, o muco secretado por estas células é responsável pela proteção contra a desidratação e o desequilíbrio metabólico, absorção de metabolitos e proteção contra parasitas (Mastrodonato *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015).

Como referido anteriormente, a camada epitelial é coberta por uma cutícula composta por fibras de colagénio inseridas numa matriz amorfa (Coggeshall *et al.*, 1966; Mastrodonato *et al.*, 2005). As fibras colagénicas da cutícula são originadas e alinhadas por células epiteliais, e não por células de origem mesenquimatosa, como nos vertebrados (Coggeshall *et al.*, 1966; Briones *et al.*, 2018). A cutícula é um fator importante na avaliação da qualidade do solo no que respeita aos efeitos de eventuais contaminantes nestes organismos, visto que esta é uma barreira significativa à difusão de moléculas hidrofílicas que poderiam ser rapidamente transportadas pela epiderme. Assim, a cutícula juntamente com a secreção mucosa do epitélio aumenta a resistência ao fluxo transintimal (Briones *et al.*, 2018).

Quanto ao nível ecológico, as minhocas podem ser classificadas em três grupos: a) epigéicas, minhocas que habitam em solos superficiais e com ciclos de vida curtos; b) endogéicas, minhocas que habitam em solos com profundidades entre os 10 a 40 cm e com longevidade intermédia; e c) anécicas, minhocas que podem ser encontradas em solos mais profundos (Steffen *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015).

Estes organismos são considerados engenheiros ecológicos, uma vez que modificam a distribuição dos nutrientes e a sua disponibilidade aos outros organismos, produzindo efeitos

significativos na estrutura e propriedades físicas do solo, devido à sua atividade de locomoção, alimentação e respiração (Licata *et al.*, 2000; Cunha *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2013; Datta *et al.*, 2016). Além disso, as minhocas representam cerca de 80% da biomassa de invertebrados terrestres, sendo capazes de: i) promover o enriquecimento e fertilidade dos solos através da decomposição de matéria orgânica e agregação do solo; ii) aumentar a biodisponibilidade de nutrientes, promovendo a fertilidade química do solo; iii) fixar o azoto biodisponível para as plantas; iv) reduzir produtos tóxicos no solo; e, v) aumentar o escoamento, infiltração e arejamento dos solos, através da atividade de escavação (Sivakumar *et al.*, 2015). No entanto, a aplicação de agroquímicos, numa determinada concentração e tempo de exposição, afeta o comportamento, a reprodução, as funções neurológicas e a atividade celular das minhocas, tanto na forma direta (absorção de partículas dissolvidas no solo por meio da cutícula), como na forma indireta (bioacumulação de resíduos por diferentes vias), podendo até mesmo aumentar a taxa de mortalidade, e assim conduzir a um desequilíbrio ecológico que poderá afetar os serviços ecossistêmicos providos, por exemplo, pelas pastagens (Papini *et al.*, 2004; Yasmin *et al.*, 2007; Kılıç *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2013; Sivakumar *et al.*, 2015; Datta *et al.*, 2016). Tal acontece, uma vez que aquando da aplicação de pesticidas numa área florestal, por exemplo, cerca de 25% alcança a folhagem das árvores, 1% atinge o inseto alvo e aproximadamente 30% afeta o solo, sendo que o restante é disperso na atmosfera e nas águas superficiais ou subterrâneas (Steffan *et al.*, 2018).

O tegumento das minhocas é a barreira mais próxima do solo, e é altamente permeável. Assim, este serve de superfície respiratória e via de captação de metais presentes no solo (Cunha *et al.*, 2011). As propriedades físico-químicas do solo, como o pH, a concentração de matéria orgânica, a capacidade de troca de catiões, potencial de oxidação-redução, teores de argilas, carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>), ferro (Fe) e óxidos de manganês (MnO), afetam o comportamento de adsorção, e consequentemente a biodisponibilidade de elementos potencialmente tóxicos no solo, como por exemplo metais pesados (Kennette *et al.*, 2002; Usman *et al.*, 2008).

O pH do solo é muito importante na determinação da especiação de metais, solubilidade de superfícies minerais, e até na mobilidade e eventual biodisponibilidade de metais pesados devido ao seu efeito de solubilidade nos solos (Aydinalp *et al.*, 2003). Existe uma correlação negativa entre o pH e a mobilidade e disponibilidade de metais pesados para os organismos

residentes do solo (animais e plantas). Ou seja, a disponibilidade destes elementos aumenta com a diminuição do pH do solo, aumentando assim a sua absorção pelos organismos do solo. Por outro lado, a existência de minhocas no solo contribui para um aumento de pH, devido à excreção de compostos de cálcio no meio envolvente, logo os elementos químicos existentes ficarão menos biodisponíveis aos outros organismos do solo (Wen *et al.*, 2004; Yasmin *et al.*, 2007). Contudo, a bioacumulação e a biomagnificação destes elementos através da cadeia trófica poderá conduzir a um eventual risco para a saúde pública (Braillier *et al.*, 1996, Oliver *et al.*, 1996; Zeng *et al.*, 2011).

Para além do pH, a concentração de matéria orgânica no solo é determinante na disponibilidade de metais pesados, pois é um fator contribuinte para a capacidade dos solos em reter metais de forma permutável, uma vez que fornece à solução do solo elementos químicos com função quelante (McCauley *et al.*, 2009).

O principal objetivo deste trabalho consistiu na avaliação dos efeitos ecotoxicológicos em *E. fetida* decorrentes da exposição destes anelídeos a solos de pastagens sujeitas a diferentes tipos de manuseio agrícola. Para tal, foram analisadas, em contexto laboratorial, alterações histológicas (espessura da epiderme e atividade secretora) em *E. fetida* decorrentes de uma exposição a curto-termo, considerada aguda (7 dias), e de uma exposição a longo termo, considerada crónica (56 dias), a solo de pastagens sujeitas a diferentes tipos de manuseio agrícola (semi-natural, permanente e intensivo). A espécie bioindicadora utilizada, *Eisenia fetida* (Saying, 1989), é considerada como organismo padrão para testes ecotoxicológicos pela OECD (2004).

### 3. Metodologia

#### 3.1 Solos (Recolha, propriedades físico-químicas e concentração de elementos potencialmente tóxicos [PTEs])

Para este estudo foram considerados três solos experimentais. Estes solos distinguem-se entre si pelo tipo de manuseio agrícola a que estão sujeitas as pastagens da ilha de São Miguel: a) solo proveniente de pastagens intensivas (INT) - solo exposto a um elevado manuseio agrícola, com aplicação regular de agroquímicos e sujeito a pastoreio intensivo; b) solo proveniente de pastagens permanentes ou extensivas (EXT) - solos em que a aplicação de agroquímicos é mais reduzida, assim como a intensidade de pastoreio; e c) solo proveniente de pastagens semi-naturais (SEMI) - solos sujeitos a um pastoreio esporádico (2 a 3 vezes no ano) e, geralmente, sem aplicação de agroquímicos.

As amostras de solo foram recolhidas da camada superficial do solo (entre 0 a 20 cm de profundidade), de forma aleatória e sistemática. Em cada pastagem, foram colhidos no total 16 sub-amostras, formando 4 amostras compostas de solo para cada tipo de manuseio agrícola e período de exposição. Para cada local, as propriedades físico-químicas do solo (matéria orgânica do solo, fração de argila-silte, pH e condutividade elétrica) foram analisadas em quadruplicado, seguindo os procedimentos recomendados e a metodologia oficial portuguesa (LNEC, 1967a, 1967b). As mesmas análises foram efetuadas para o solo utilizado como controlo neste estudo (solo LUFA).

Foram determinadas, por Espectrofotometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente (IPS/MS) e Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP/OES; Activation Laboratories Ltd., Canadá), as concentrações nos solos dos seguintes PTEs: cobre (Cu), lítio (Li), crómio (Cr), vanádio (V), manganês (Mn), cobalto (Co), zinco (Zn), arsénio (As), molibdénio (Mo), cádmio (Cd), rubídio (Rb), urânio (U), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg). O controlo de qualidade foi assegurado pela análise de amostras duplicadas, brancos e materiais de referência (GXR-1, GXR-4, GXR-6 e USGS SAR-M).

#### 3.2 Organismo de estudo

Para este trabalho, o organismo de estudo utilizado foi a minhoca da espécie *Eisenia fetida* (Saying, 1989), visto que esta não só pode ser facilmente multiplicada em laboratório, com um ciclo de maturação curto e com taxas de reprodução elevadas (Booth *et al.*, 2001; Yasmin

*et al.*, 2007; Datta *et al.*, 2016), como também por ser um organismo edáfico, e por isso ser um ótimo bioindicador de exposição a contaminantes do meio envolvente. Assim, foi constituída uma cultura sincronizada com um total de 819 minhocas adultas (4 meses de idade), com peso compreendido entre os 300 e os 600 mg por indivíduo. Esta população *stock* foi mantida em condições laboratoriais de temperatura ( $20 \pm 1$  ° C), fotoperíodo (16 hL: 8 hD) e em substrato padronizado a 40% de humidade, de acordo com a diretiva OECD 222 (OECD, 2004). A população *stock* de minhocas foi mantida em substrato composto por uma mistura de turfa e estrume de cavalo (50:50), e  $\text{CaCO}_3$  (para ajuste de pH entre 6 e 7). Este substrato foi semanalmente hidratado (para padronização da humidade) e o pH foi monitorizado e corrigido, quando necessário.

### **3.3 Exposição Laboratorial**

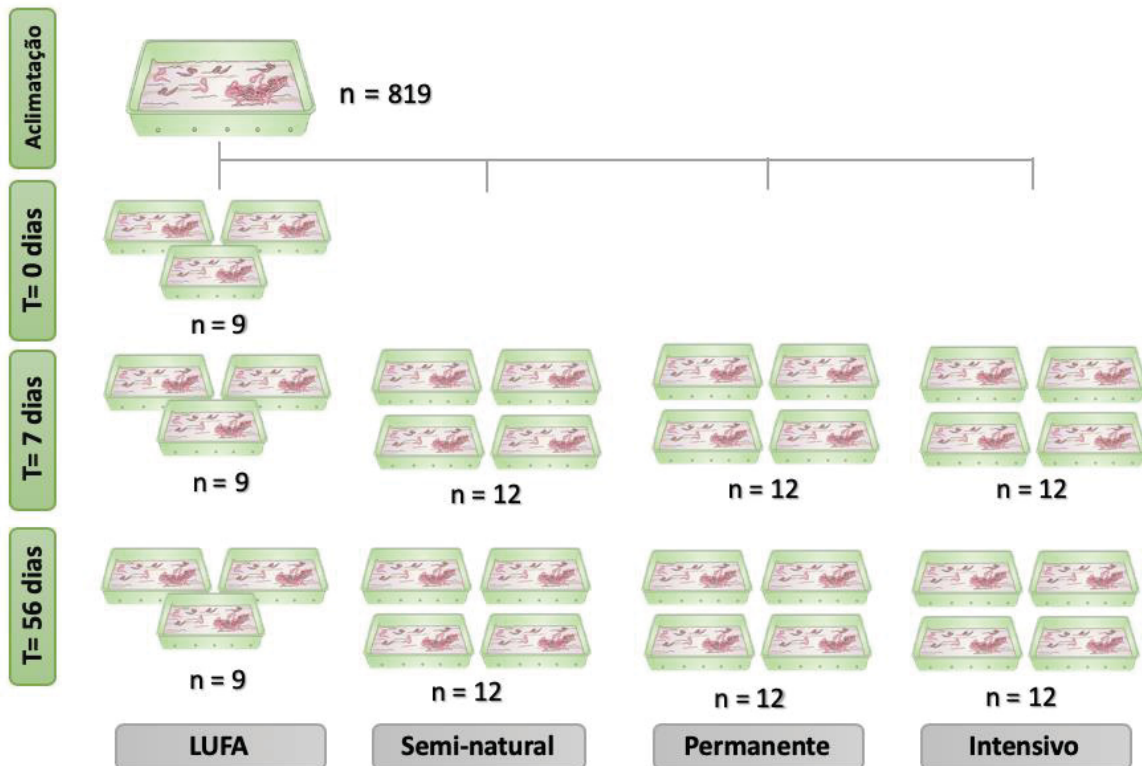
Antes do início da exposição laboratorial de *E. fetida* aos solos experimentais, as minhocas foram aclimatadas num solo natural não contaminado (LUFA 2.2, Speyer), com características arenosas e argilosas (1,93% carbono orgânico e pH- $\text{CaCl}_2$  5,5), nas condições experimentais definidas no ponto 3.2. As minhocas foram removidas do contentor de aclimatização, agrupadas aleatoriamente em grupos de 13 indivíduos e expostas a 1000 g de cada solo experimental [doravante designados de semi-natural (SEMI), permanente (EXT) ou intensivo (INT), consoante a respetiva pastagem de proveniência], em caixas plásticas de acrílico transparente (19,5 cm x 15 cm x 10 cm), cobertas com uma malha de nylon de 300  $\mu\text{m}$ . Os ensaios foram realizados nas mesmas condições para o solo LUFA 2.2 (Speyer), usado como controlo neste estudo.

Foram efetuados 4 replicados (caixas) para cada solo experimental (SEMI, EXT e INT) e 3 replicados (caixas) para o solo LUFA (controlo).

Neste estudo, foram considerados dois períodos de exposição (7 e 56 dias, exposição aguda e exposição crónica, respetivamente), para além do período correspondente ao início do ensaio, utilizado como referência experimental ( $t = 0$  dias). Ao fim de 7 e 56 dias de exposição, as minhocas foram removidas de cada caixa e mantidas em papel de filtro humedecido durante 24 h, para permitir a libertação do conteúdo intestinal antes do processamento histológico. No fim de cada período ( $t = 0$ ,  $t = 7$  e  $t = 56$  dias) foram usadas 3 minhocas para a análise histomorfométrica, sendo que as restantes foram destinadas a

outros ensaios ecotoxicológicos no âmbito do projeto BIOINVENT, como ilustrado na Figura 3.

Todo o ensaio decorreu a  $20 \pm 1$  ° C, com fotoperíodo 16 hL: 8 hD, de acordo com as condições descritas no ponto 3.2. Durante o ensaio, as minhocas foram semanalmente suplementadas com 5 g de estrume de cavalo esterilizado (por caixa) e cada caixa foi monitorizada para perda de humidade (correção com água destilada).



**Figura 3:** Esquema representativo do procedimento experimental. Numa primeira fase, as minhocas foram acimatadas no solo LUFA durante uma semana. De seguida, as minhocas foram distribuídas aleatoriamente em caixas por tempos de exposição e por diferentes tipos de solo experimental. A letra “n” corresponde ao número de minhocas utilizado para análise histomorfométrica.

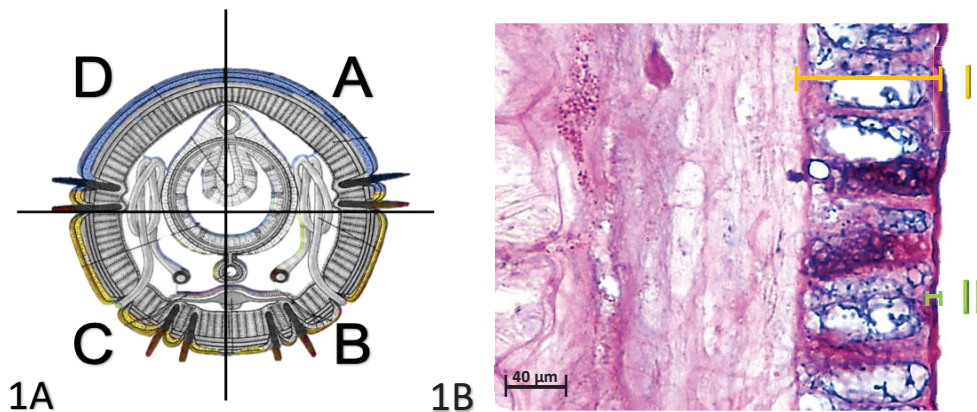
### 3.4 Processamento Histológico

De cada uma das minhocas selecionadas para o estudo histomorfométrico foi retirada uma porção pós-clitelo de cerca de 0.5 cm, fixada em formaldeído tamponado a 4%, seguido de processamento histológico, utilizando etanol como agente desidratante, xileno como agente diafanizante e, por fim, impregnação em parafina e inclusão em blocos. Após a

obtenção dos blocos, realizaram-se cortes transversais de 4  $\mu\text{m}$  de espessura (no mínimo de 10 cortes por indivíduo). Por fim, para ser possível uma análise dos mucopolissacáridos neutros e dos ácidos, foi realizada a Coloração Ácido Periódico-Schiff – Azul de Alcian (PAS-AB) (metodologia descrita no Anexo 1). A Coloração Ácido Periódico-Schiff (PAS) tem afinidade por glicoconjugados neutros, corando-os de magenta, enquanto que a Coloração Azul de Alcian (AB), a pH 2.5, evidencia os mucopolissacáridos ácidos e mucinas acéticas, corando-os de azul (Cinar *et al.*, 2014). Após a coloração, as preparações foram montadas em resina (DPX).

### 3.5 Análise Histomorfométrica

Para a análise histomorfométrica, foram realizadas medições (duas réplicas [cortes] de cada medição por indivíduo) através do *software* Image Pro-Plus com ampliação de 400x. Foi obtida a espessura do epitélio e da cutícula, as quais foram medidas em quatro secções do corte (duas na região dorsal e duas na região ventral), por cada réplica (Figura 4); foi também calculada a proporção de espaço ocupado pelas diferentes células glandulares de acordo com o tipo de secreção PAS-positivo (de cor magenta) e AB-positivo (de cor azul).



**Figura 4:** 1A. Esquema de um modelo de minhoca em corte transversal. Medições efetuadas em A e D correspondem à região dorsal, e em B e C correspondem à região ventral. 1B. Exemplificação da medição de espessura do epitélio (I) e cutícula (II) num corte transversal de *Eisenia fetida*.

A proporção de espaço ocupado pelas diferentes células glandulares foi obtida a partir do espaço linear ocupado por cada tipo celular num comprimento constante de 280  $\mu\text{m}$ .

Posteriormente foi-lhes atribuído o valor de 0 a 4 correspondente à proporção aproximada entre 0 e 100%, como indicado na tabela 1.

**Tabela 1:** Categorias atribuídas (0 a 4) às proporções (0 – 100%) de cada tipo de secreção: PAS-positivo (magenta) e AB-positivo (azul).

Valor atribuído	Proporção aproximada
0	0%
1	1 - 19%
2	20 - 49%
3	50 - 79%
4	80 - 100%

### 3.6 Análise Estatística

A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Verificou-se a homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Sempre que necessário, os dados foram transformados por  $\log x$ . Os dados referentes à espessura do epitélio e da cutícula foram analisados através do Teste de Tukey e o Teste-t. A distribuição de frequências e as proporções associadas ao tipo de secreção foram comparadas através do teste de Mann-Whitney e do teste de *Qui-Quadrado*, respectivamente. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software SPSS 23.0*, assumindo-se uma significância estatística de 5%.

## 4. Resultados

### 4.1 Análise dos Solos Experimentais

Através da Tabela 2 é possível analisar as concentrações de PTEs presentes nos solos experimentais. Desta forma, verifica-se que o solo semi-natural contém um maior número de PTEs com concentrações elevadas (V, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Pb e Cr), relativamente aos restantes solos experimentais. No que diz respeito às propriedades físico-químicas dos solos, verifica-se que o pH dos diferentes solos experimentais varia entre 5.5 e 5.9, sendo todos eles solos ácidos. Contudo, a condutividade elétrica é mais elevada no solo intensivo do que nos restantes solos, a percentagem de argila-silte é maior no solo semi-natural e a percentagem de matéria orgânica é mais elevada no solo intensivo do que nos restantes solos (Tabela 2).

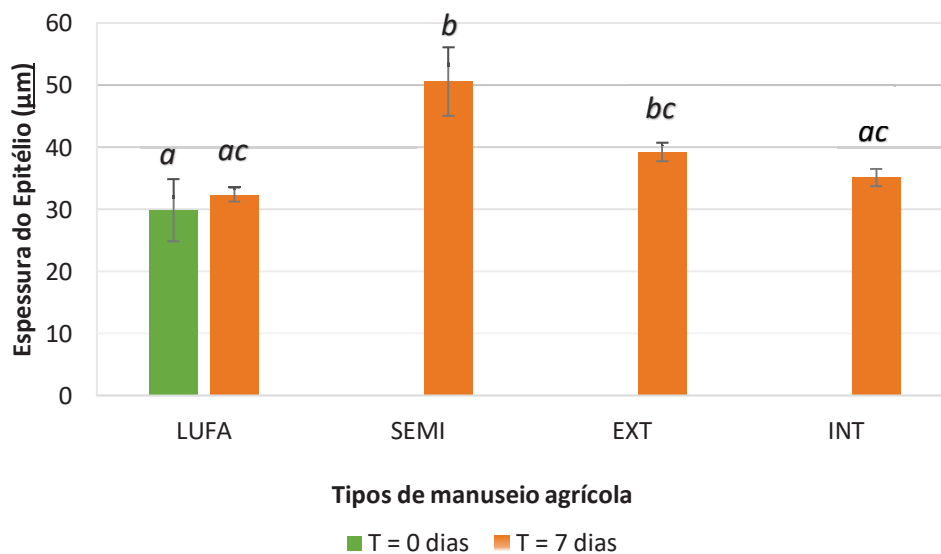
**Tabela 2:** Média ( $\pm$  DP) da concentração de PTEs ( $\text{mg.kg}^{-1}$ , d.w.) em amostras dos solos experimentais: semi-natural (SEMI), permanente (EXT) e intensivo (INT). Valores médios ( $\pm$  DP) das propriedades físico-químicas dos solos: LUFA (Speyer), SEMI, EXT e INT.

Concentrações de PTEs ( $\text{mg.kg}^{-1}$ , d.w.)															
Solo	V	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Rb	Mo	Cd	Pb	U	Hg	Li	Cr
SEMI	27.50	494.05	3.18	7.80	4.50	66.95	0.68	10.73	2.69	0.11	6.05	2.63	0.05	5.03	16.50
	$\pm$ 4.12	$\pm$ 175.87	$\pm$ 1.08	$\pm$ 3.03	$\pm$ 1.28	$\pm$ 13.56	$\pm$ 0.46	$\pm$ 0.93	$\pm$ 0.51	$\pm$ 0.05	$\pm$ 0.95	$\pm$ 0.40	$\pm$ 0.02	$\pm$ 0.05	$\pm$ 3.32
EXT	7.50	496.50	1.08	2.68	2.03	47.53	2.85	23.30	2.45	0.16	5.40	3.05	0.05	5.15	11.25
	$\pm$ 1.92	$\pm$ 91.70	$\pm$ 0.50	$\pm$ 1.63	$\pm$ 0.62	$\pm$ 3.83	$\pm$ 0.87	$\pm$ 19.81	$\pm$ 0.73	$\pm$ 0.04	$\pm$ 0.80	$\pm$ 0.59	$\pm$ 0.01	$\pm$ 0.26	$\pm$ 2.06
INT	9.25	438.25	1.10	2.30	2.03	47.43	7.90	23.98		0.32	5.95	3.70	0.10	4.43	12.75
	$\pm$ 0.96	$\pm$ $\pm$ 6.02	$\pm$ 0.13	$\pm$ 0.34	$\pm$ 0.62	$\pm$ 1.34	$\pm$ 1.53	$\pm$ 3.12	$\pm$ 0.14	$\pm$ 0.02	$\pm$ 0.13	$\pm$ 0.14	$\pm$ 0.01	$\pm$ 0.19	$\pm$ 1.50
Propriedades Físico-químicas															
Solo	pH		Condutividade elétrica ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )				Argila – Silte (%)			Matéria orgânica (%)					
LUFA	5.6 $\pm$ 0.4		9.2 $\pm$ 1.4				N/A			1.71 $\pm$ 0.3					
SEMI	5.6 $\pm$ 0.2		8.0 $\pm$ 1.2				2.4 $\pm$ 1.1			4.3 $\pm$ 2.4					
EXT	5.5 $\pm$ 0.2		9.8 $\pm$ 2.0				1.9 $\pm$ 0.3			5.4 $\pm$ 1.9					
INT	5.9 $\pm$ 0.3		13.2 $\pm$ 1.3				1.9 $\pm$ 1.4			6.1 $\pm$ 2.5					

## 4.2 Análise dos Biomarcadores

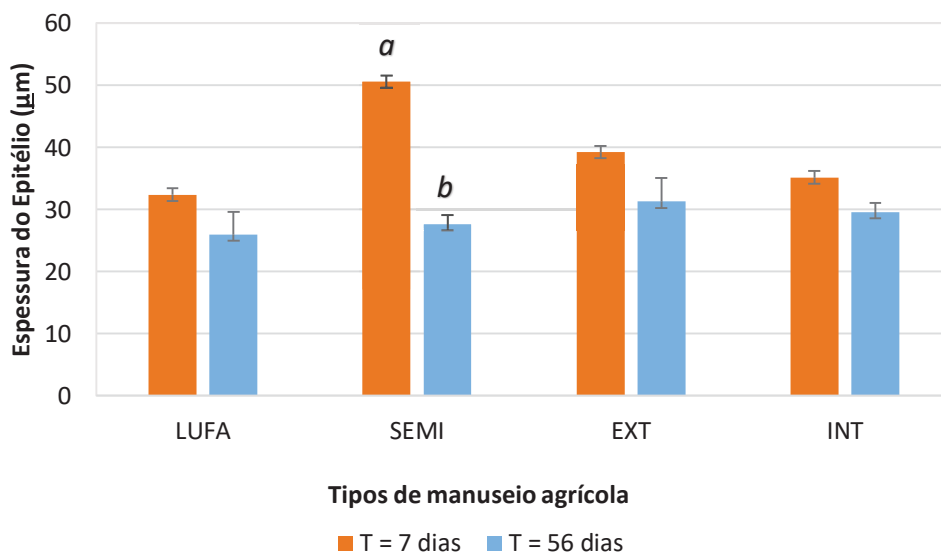
### 4.2.1 Espessura do Epitélio

Podemos verificar que aos 7 dias há um aumento da espessura do epitélio em todos os tipos de solo experimental em relação ao controlo (T0 LUFA), embora este aumento só seja significativo nas minhocas provenientes dos solos semi-natural e permanente (Figura 5). Aos 56 dias, a espessura do epitélio diminui em todos os tipos de solos, à exceção do solo permanente, em relação ao T0 LUFA; contudo, as diferenças observadas não são significativas (ANOVA,  $F [4,43 = 0,464]$ ,  $P = 0,761$ ).



**Figura 5:** Espessura (média  $\pm$  EP) do epitélio de *E. fetida* no início do ensaio (controlo T0 LUFA – barra verde) e após exposição durante 7 dias (barras a laranja) a diferentes tipos de solo. Para cada barra, letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre grupos estudados (Teste de Tukey,  $P < 0.05$ ).

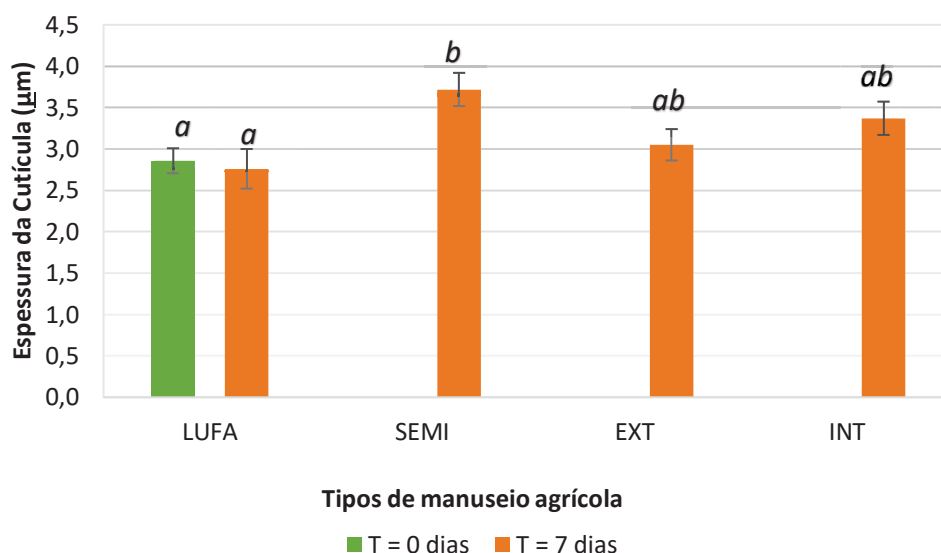
Ao analisar as diferenças da espessura do epitélio entre os tempos de exposição para cada tipo de solo (Figura 6), é possível verificar que, independentemente do solo experimental, a espessura do epitélio diminui ao fim de 56 dias de exposição. No entanto, esta diminuição apenas foi significativa nas minhocas expostas ao solo da pastagem semi-natural ( $P = 0,002$ , teste-t).



**Figura 6:** Espessura (média  $\pm$  EP) do epitélio de *E. fetida* para cada tipo de solo ao fim da exposição de  $t = 7$  (barras a laranja) e de  $t = 56$  dias (barras a azul). Para cada tipo de solo, as diferentes letras entre barras representam as diferenças significativas entre os tempos de exposição (Teste-t,  $P < 0.05$ ).

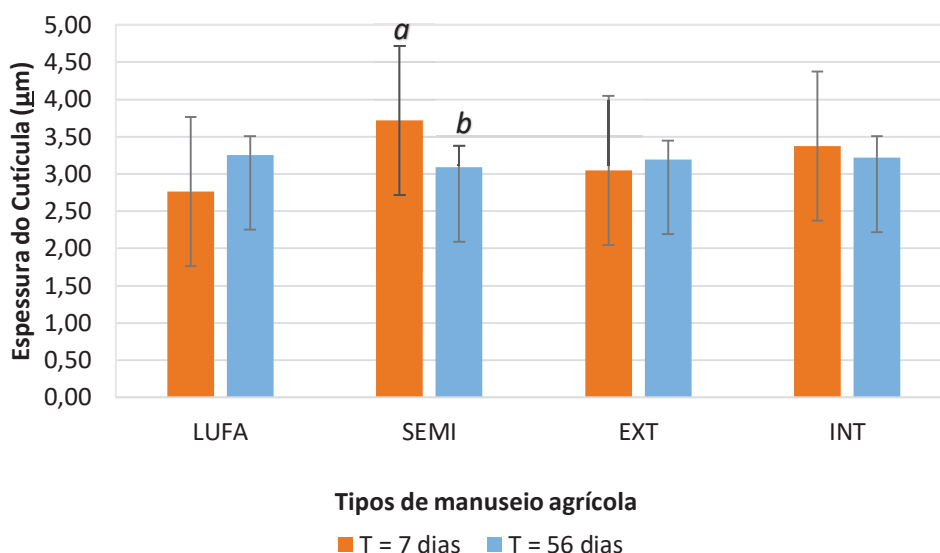
#### 4.2.2 Espessura da Cutícula

Em relação à variável cutícula, na figura 7, podemos verificar que aos 7 dias há um aumento da espessura da cutícula em todos os tipos de solo em relação ao início do ensaio (T0 LUFA); contudo este aumento apenas foi significativo nas minhocas provenientes do solo semi-natural. Aos 56 dias, a espessura da cutícula aumentou em todos os tipos de solos em relação ao T0 LUFA; contudo, as diferenças observadas não são significativas (ANOVA,  $F [4,43 = 2,086]$ ,  $P = 0,099$ ).



**Figura 7:** Espessura (média  $\pm$  EP) da cutícula de *E. fetida* no início do ensaio (controlo T0 LUFA – barra verde) e após exposição durante 7 dias (barras a laranja) a diferentes tipos de solo. Para cada barra, letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre grupos estudados (Teste de Tukey,  $P < 0.05$ ).

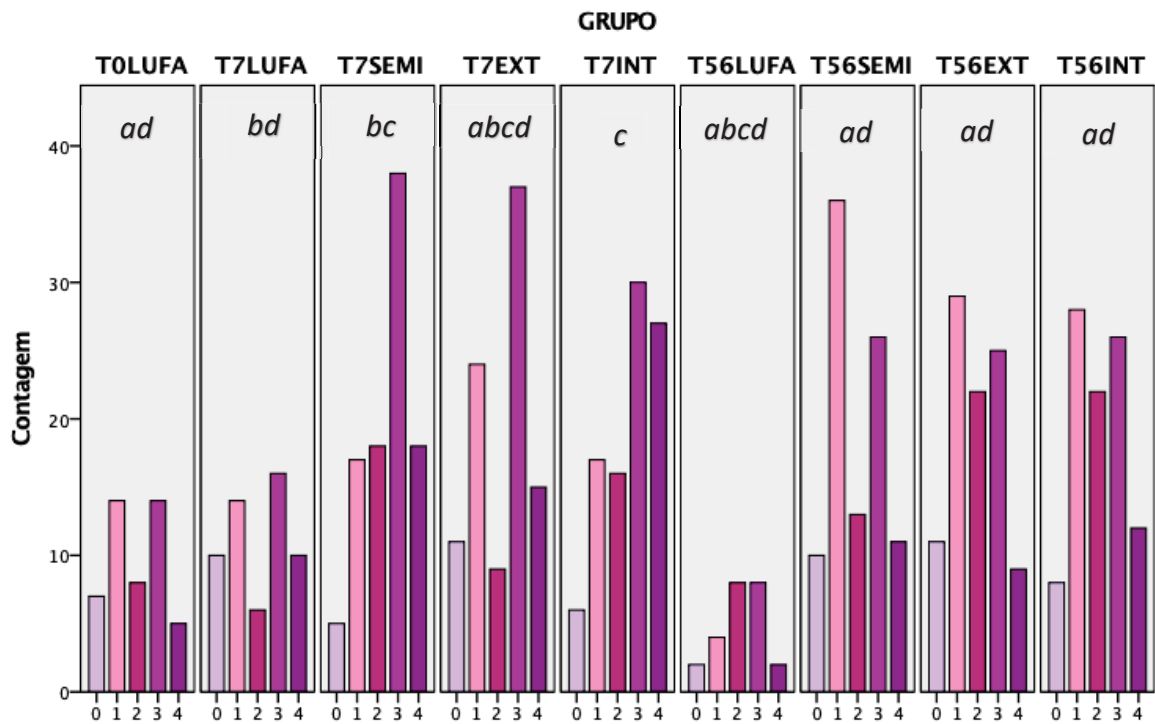
Ao analisar as diferenças da espessura da cutícula entre os tempos de exposição para cada tipo de solo (Figura 8), é possível verificar que para os solos LUFA e permanente, ao fim de 56 dias, a espessura da cutícula aumentou; contudo, as diferenças não são significativas ( $t [10 = -1,116]$ ,  $P = 0,291$  e  $t [22 = -0,670]$ ,  $P = 0,510$ , respetivamente). Para os solos semi-natural e intensivo espessura da cutícula diminuiu ao fim de 56 dias, sendo que esta diminuição foi significativa nas minhocas expostas ao solo da pastagem semi-natural ( $P = 0,007$ , teste-t), enquanto que no solo de pastagem intensivo não foram observadas diferenças significativas ( $t [23 = 0,665]$ ,  $P = 0,513$ ).



**Figura 8:** Espessura (média  $\pm$  EP) da cutícula de *E. fetida* para cada tipo de solo ao fim da exposição de t = 7 (barras a laranja) e de t = 56 dias (barras a azul). Para cada tipo de solo, as diferentes letras entre barras representam as diferenças significativas entre os tempos de exposição (Teste-t,  $P < 0.05$ ).

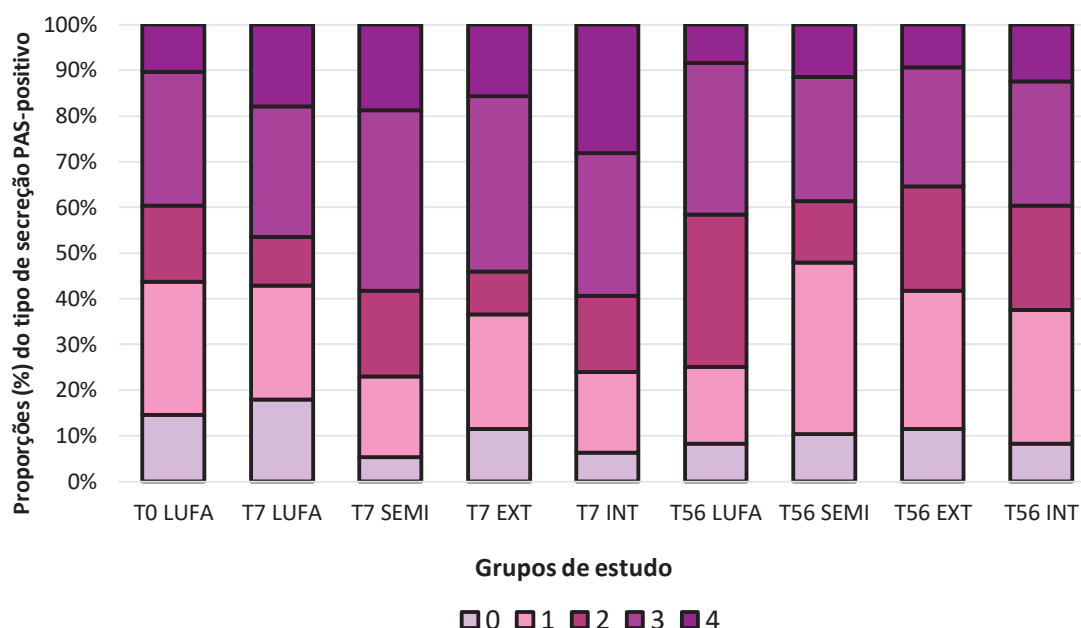
#### 4.2.3 Secreção de origem colagénica (PAS-positivo)

No que diz respeito à distribuição de frequências absolutas de cada classificação atribuída ao tipo de secreção PAS-positivo (0,1, 2, 3 e 4) para os diferentes tipos de manuseio agrícola em diferentes períodos de exposição (grupos de estudo), o solo intensivo aos 7 dias (T7 INT) apresenta uma distribuição significativamente diferente de T0 LUFA, T7 LUFA, T56 SEMI, T56 EXT e T56 INT (Figura 9).



**Figura 9:** Distribuição de frequências absolutas de cada classificação atribuída ao tipo de secreção PAS-positivo do epitélio de *E. fetida* nos diferentes tipos de grupos de estudo. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre grupos estudados (Teste de Mann Whitney,  $P < 0.05$ ).

De uma forma geral, o grupo de estudo onde houve maior secreção PAS-positivo (classificação 4) foi o do solo intensivo aos 7 dias (T7 INT = 28,10%), sendo este significativamente diferente dos grupos T0 LUFA, T7 EXT, T56 LUFA, T56 SEMI e T56 EXT (Figura 10).

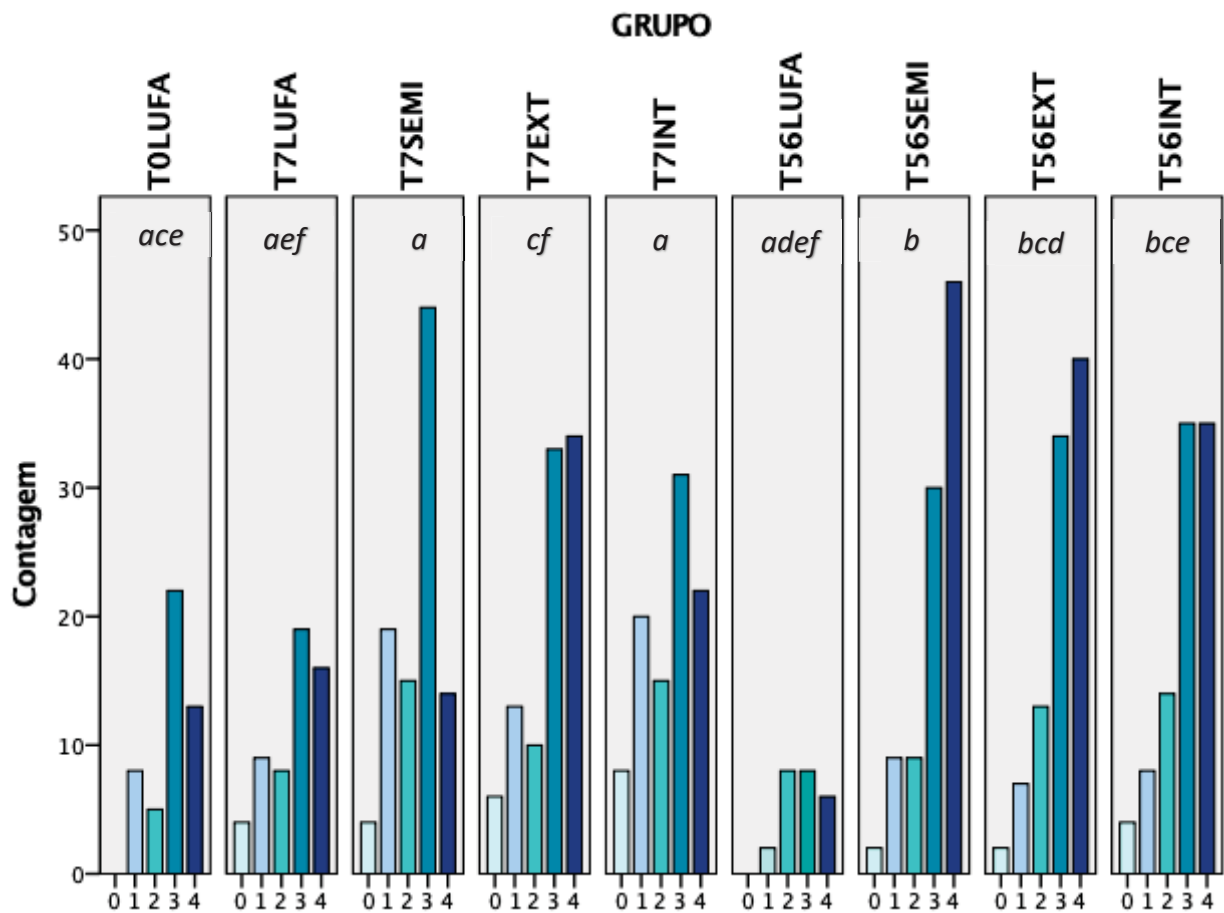


	T0 LUFA	T7 LUFA	T7 SEMI	T7 EXT	T7 INT	T56 LUFA	T56 SEMI	T56 EXT	T56 INT
4	10,4% <sup>a</sup>	17,9% <sup>a,b</sup>	18,8% <sup>a,b</sup>	15,6% <sup>a</sup>	28,1% <sup>b</sup>	8,3% <sup>a</sup>	11,5% <sup>a</sup>	9,4% <sup>a</sup>	12,5% <sup>a</sup>
3	29,2% <sup>a,b</sup>	28,6% <sup>a,b</sup>	39,6% <sup>b</sup>	38,5% <sup>a,b</sup>	31,3% <sup>a,b</sup>	33,3% <sup>a,b</sup>	27,1% <sup>a,b</sup>	26,0% <sup>a</sup>	27,1% <sup>a,b</sup>
2	16,7% <sup>a,b,c,d,e</sup>	10,7% <sup>d,e</sup>	18,8% <sup>a,b,c,d,e</sup>	9,4% <sup>c,e</sup>	16,7% <sup>a,b,c,d,e</sup>	33,3% <sup>b</sup>	13,5% <sup>a,c,d,e</sup>	22,9% <sup>a,b,d</sup>	22,9% <sup>a,b,d</sup>
1	29,2% <sup>a,b,c,d</sup>	25,0% <sup>a,b,c,d</sup>	17,7% <sup>c,d</sup>	25,0% <sup>a,b,c,d</sup>	17,7% <sup>b,d</sup>	16,7% <sup>a,b,c,d</sup>	37,5% <sup>a</sup>	30,2% <sup>a</sup>	29,2% <sup>a,b,c,d</sup>
0	14,6% <sup>a,b</sup>	17,9% <sup>b</sup>	5,2% <sup>a</sup>	11,5% <sup>a,b</sup>	6,3% <sup>a</sup>	8,3% <sup>a,b</sup>	10,4% <sup>a,b</sup>	11,5% <sup>a,b</sup>	8,3% <sup>a,b</sup>

**Figura 10:** Proporções (%) do tipo de secreção PAS-positivo do epitélio de *E. fetida* nos diferentes grupos de estudo. Na tabela, estão apresentadas as percentagens relativas de cada classificação atribuída ao tipo de secreção PAS-positivo, para cada grupo estudado. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas na proporção de cada classificação entre os grupos estudados (Teste de Qui-Quadrado,  $P < 0.05$ ).

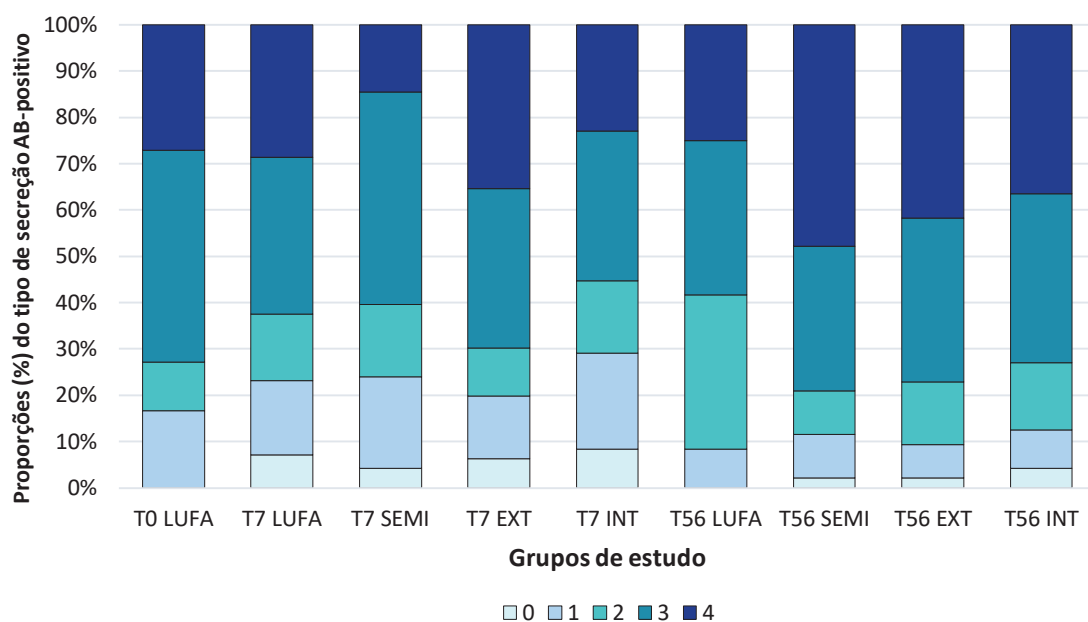
#### 4.2.4 Secreção de mucopolissacarídeos ácidos (AB-positivo)

No que diz respeito à distribuição de frequências absolutas de cada classificação atribuída ao tipo de secreção AB-positivo (0, 1, 2, 3 e 4) para os manuseios agrícolas em diferentes períodos de exposição (grupos de estudo), o solo semi-natural aos 56 dias (T56 SEMI) apresenta uma distribuição significativamente diferente de todos os grupos em estudo, à exceção dos solos permanente e intensivo aos 56 dias (Figura 11).



**Figura 11:** Distribuição de frequências absolutas de cada classificação atribuída ao tipo de secreção AB-positivo do epitélio de *E. fetida* nos diferentes tipos de grupos de estudo. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre grupos estudados (Teste de Mann Whitney,  $P < 0.05$ ).

O grupo de estudo onde houve maior secreção AB-positivo (classificação 4), foi o do solo semi-natural aos 56 dias de exposição (T56 SEMI = 47,90%), sendo este significativamente diferente de todos os restantes grupos de estudo à exceção de T7 EXT, T56 EXT e T56 INT (Figura 12).



	T0 LUFA	T7 LUFA	T7 SEMI	T7 EXT	T7 INT	T56 LUFA	T56 SEMI	T56 EXT	T56 INT
4	27,10% <sup>a,b,c,d,e</sup>	28,60% <sup>d,e</sup>	14,60% <sup>c</sup>	35,40% <sup>a,b,d,e,f</sup>	22,90% <sup>b,c,e</sup>	25,00% <sup>a,b,c,d,e</sup>	47,90% <sup>f</sup>	41,70% <sup>a,d,f</sup>	36,50% <sup>a,d,f</sup>
3	45,80% <sup>a,b</sup>	33,90% <sup>a,b</sup>	45,80% <sup>b</sup>	34,40% <sup>a,b</sup>	32,30% <sup>a,b</sup>	33,30% <sup>a,b</sup>	31,30% <sup>a</sup>	35,40% <sup>a,b</sup>	36,50% <sup>a,b</sup>
2	10,40% <sup>a</sup>	14,30% <sup>a,b</sup>	15,6% <sup>a</sup>	10,40% <sup>a</sup>	15,60% <sup>a</sup>	33,30% <sup>b</sup>	9,40% <sup>a</sup>	13,50% <sup>a</sup>	14,60% <sup>a</sup>
1	16,70% <sup>a,b</sup>	16,10% <sup>a,b</sup>	19,80% <sup>b</sup>	13,50% <sup>a,b</sup>	20,80% <sup>b</sup>	8,30% <sup>a,b</sup>	9,40% <sup>a</sup>	7,30% <sup>a</sup>	8,30% <sup>a</sup>
0	0,00% <sup>a</sup>	7,10% <sup>a,b</sup>	4,20% <sup>a,b</sup>	6,30% <sup>a,b</sup>	8,30% <sup>b</sup>	0,00% <sup>a,b</sup>	2,10% <sup>a,b</sup>	2,10% <sup>a,b</sup>	4,20% <sup>a,b</sup>

**Figura 12:** Proporções (%) do tipo de secreção AB-positivo do epitélio de *E. fetida* nos diferentes tipos de grupos de estudo. Na tabela, estão apresentadas as percentagens relativas de cada classificação atribuída ao tipo de secreção azul, para cada tipo de grupo estudado. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas na proporção de cada classificação entre os grupos estudados (Teste de Qui-Quadrado,  $P < 0.05$ ).

## 5. Discussão

O solo semi-natural é aquele que apresentou uma maior concentração de PTEs (Tabela 2), entre eles: vanádio (V), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn) e crómio (Cr). De acordo com Neuhauser (1985), os elementos-traço Cu, Zn e Ni são também considerados metais pesados com maior toxicidade para as minhocas (Cu > Zn > Ni, ordem decrescente de toxicidade), podendo causar redução ou a erradicação da população destes organismos no solo. Contudo, os metais Cu e Zn são considerados oligoelementos essenciais ao equilíbrio metabólico humano. Por exemplo, o Zn participa como cofator de várias enzimas que ajudam na resposta ao sistema imunológico (Steffan *et al.*, 2018). Note-se que para qualquer elemento essencial, existe uma concentração “ideal” que contribui para o bom funcionamento do metabolismo humano, como também o suprimento ou excesso desses elementos, num determinado grau de exposição tornam-se tóxicos, podendo resultar em morbidade e em alguns casos em mortalidade.

De acordo com o observado por Sivakumar *et al.* (2015), as concentrações de PTEs analisados nos solos experimentais deste trabalho não são consideradas letais para a espécie *E. fetida*. No entanto, é importante referir que a biodisponibilidade e toxicidade destes metais para as minhocas, não depende apenas da concentração total dos metais existentes nos solos, mas também das propriedades e das características físicas e químicas dos mesmos [como por exemplo a textura, o pH, a quantidade de matéria orgânica, condutividade elétrica (Kennette *et al.*, 2002; Aydinalp *et al.*, 2003; Amaral *et al.*, 2006; Usman *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2011; Sivakumar *et al.*, 2015)].

Os metais pesados podem estar presentes no solo sob diversas formas e em vários níveis de solubilidade, que os tornam mais ou menos biodisponíveis para os organismos: a) dissolvidos (em solução no solo); b) permutáveis (em componentes orgânicos e inorgânicos); c) em componentes estruturais de redes de minerais dos solos; d) sob forma de precipitados insolúveis com outros componentes do solo. Nas duas primeiras formas, os metais encontram-se mais biodisponíveis para os organismos, enquanto que nas últimas duas só estão disponíveis a longo prazo (Aydinalp *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2011). Assim, a capacidade de um organismo absorver um determinado metal depende principalmente da sua mobilidade e biodisponibilidade no solo. De uma forma geral, os metais podem ser retidos no solo por diferentes mecanismos como a adsorção e precipitação. Por exemplo, a elevada

capacidade de adsorção e imobilização dos metais pesados deve-se ao elevado conteúdo de matéria orgânica e  $\text{CaCO}_3$  (Usman *et al.*, 2008).

O tipo de solo e a distribuição de tamanho de agregados também são fatores importantes para avaliar as concentrações de metais nos solos (Qian *et al.*, 1996; Farshadirad *et al.*, 2019). A maior concentração de metais pesados é evidenciada quando o solo é constituído por frações granulométricas mais finas, devido ao aumento das áreas superficiais, maior teor de argila e matéria orgânica (Qian *et al.*, 1996). De acordo com Huang *et al.* (2014), as partículas mais finas favorecem a acumulação do metal, uma vez que as condições do solo promovem a precipitação, a adsorção e a formação de complexos em agregados minerais orgânicos. Por outro lado, nos solos em que as frações granulométricas são maiores, os metais pesados estarão mais biodisponíveis para os organismos (Farshadirad *et al.*, 2019).

A quantidade de matéria orgânica é também um fator importante na mobilidade e disponibilidade de metais pesados no solo. Este fator não só atua na formação de complexos, como também tem um papel importante na retenção dos metais pesados na sua forma permutável (Aydinalp *et al.*, 2003). Por exemplo, a matéria orgânica particulada e os argilominerais utilizam hidróxidos de Fe e Mn para formar complexos. No caso dos argilominerais, estes possuem capacidade de troca iónica devido à presença de cargas elétricas, maioritariamente negativas com o aumento do pH do meio. Aquando da dissolução dos radicais  $\text{COOH}^-$  e  $\text{OH}^-$  em água, são originados compostos orgânicos sintetizados por microrganismos (ácidos húmicos e fúlvicos) com capacidade de adsorver e quelar os metais (Aydinalp *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2015).

Como referido anteriormente, quando os metais se encontram na sua forma dissolvida ou permutável e os solos apresentam pouca quantidade de matéria orgânica, os metais pesados tornam-se mais biodisponíveis à absorção (Aydinalp *et al.*, 2003; Usman *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2011). Neste trabalho, o solo experimental com menor quantidade de matéria orgânica e com maior percentagem de argila-silte era o solo semi-natural ( $4.3\% \pm 2.4$  e  $2.4\% \pm 1.1$ , respetivamente) (Tabela 2), o que o torna um solo com maior capacidade de os metais pesados presentes estarem mais biodisponíveis do que nos restantes solos estudados.

A concentração de um metal pesado no solo depende também do equilíbrio de pH entre a solução do solo e a fase sólida (Aydinalp *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2011). Os solos têm maior capacidade de reter os metais pesados quando o pH aumenta (Brailier *et al.*, 1996, Oliver *et al.*, 1996), e em algumas situações quando o pH é ligeiramente alcalino (Aydinalp *et al.*, 2003).

Logo, a mobilidade e biodisponibilidade dos metais pesados geralmente aumenta com a diminuição do pH do solo. De acordo com o observado por Fuller (1977), em solos ácidos, em que o pH variava entre 4.2 e 6.6, os metais Cd, Ni e Zn são muitíssimo móveis, o Cr tem um comportamento moderado e o Cu e o Pb são praticamente imóveis. Contudo, em solos neutros e alcalinos, em que o pH variava entre 6.7 a 7.8, o Cr é altamente móvel, Cd e Zn são moderadamente móveis e Ni é imóvel. De acordo com Cunha *et al.* (2011), quando o pH do solo é relativamente baixo, o aumento da biodisponibilidade destes metais é devido à redução da adsorção destes catiões divalentes sobre os óxidos de Fe e Mn. Quando existem mudanças no potencial de oxidação-redução, há maior capacidade de solubilização dos metais pesados e menor capacidade de adsorção aos sedimentos, e por isso estes encontram-se mais biodisponíveis para organismos animais e plantas (Aydinalp *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2015).

Neste trabalho verificou-se que os solos em estudo apresentam um pH similar, sendo caracterizados como solos ácidos (pH entre 5.5 a 5.9). Assim, os metais estariam na sua grande maioria mais biodisponíveis para os organismos que se encontram nestes solos.

Contudo, o solo semi-natural reúne todas as condições para uma maior biodisponibilidade dos metais para as minhocas, visto ser o solo que tem maior concentração de metais mais tóxicos para estes organismos (Cu, Zn e Ni) e com características físico-químicas suscetíveis à sua mobilidade e biodisponibilidade, nomeadamente no que respeita a um menor teor de matéria orgânica (Figura 13). Note-se que no solo semi-natural, embora não tenha aplicação de agroquímicos, está sujeito a um pastoreio esporádico. Desta forma, os PTEs existentes neste tipo de solo não são apenas derivados de natureza vulcânica, como também advêm dos excrementos dos animais que por lá são apascentados, sendo o estrume animal uma fonte importante de metais pesados para os solos (Zhang *et al.*, 2012).

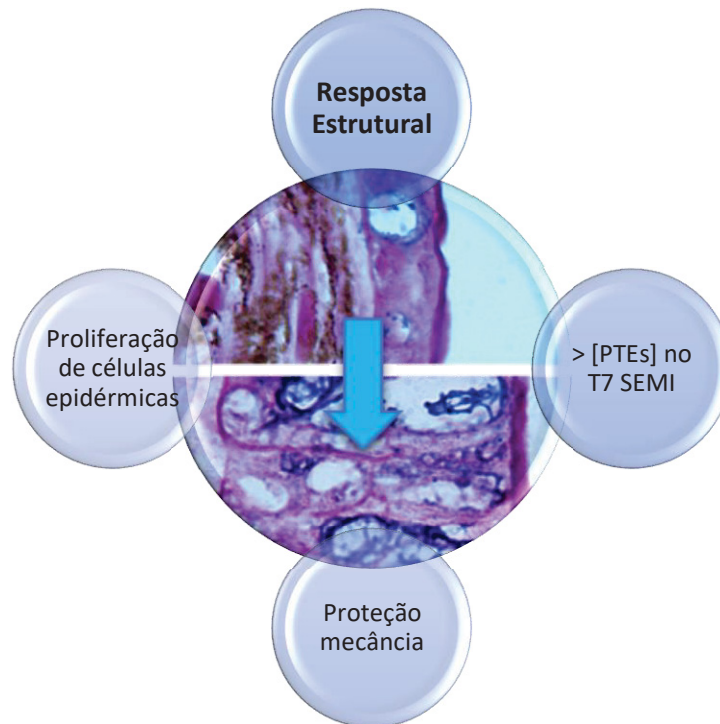


**Figura 13:** Diagrama explicativo das condições necessárias (características físico-químicas do solo) à biodisponibilidade dos metais pesados para os organismos do solo e plantas.

No que diz respeito ao parâmetro espessura do epitélio de *E. fetida*, verificou-se um aumento significativo ao fim de 7 dias de exposição ao solo semi-natural; também, se verificou um aumento da espessura da cutícula neste grupo de estudo (T7 SEMI). Com o aumento da espessura do epitélio houve maior produção da secreção de origem colagénica, e por isso levou ao aumento da espessura da cutícula, uma vez que, a cutícula é constituída por fibras colagénicas de origem epitelial (Coggeshall *et al.*, 1966). Assim, a espessura da epiderme aumentou no seu conjunto (epitélio e cutícula) conferindo proteção mecânica com o meio envolvente por ser considerada a barreira de contacto (Wang *et al.*, 2011; Cinar *et al.*, 2014).

Sendo *E. fetida* um organismo pertencente ao nicho ecológico epigéico, em que a sua atividade é limitada à superfície do solo, e por isso mais exposta ao *stress* ambiental (Briones *et al.*, 2018), o aumento da espessura do epitélio que se observou nos indivíduos expostos ao solo semi-natural provavelmente resultou de uma resposta estrutural da epiderme devido à proliferação celular das células epidérmicas, associada a uma proteção mecânica conferida pelo aumento da espessura da cutícula, tal como se propõe no esquema apresentado na figura 14. Esta proliferação das células epidérmicas poderá ser uma resposta resultante do “impacto” dos metais presentes no solo, tal como foi observado num estudo com a minhoca *Lumbricus terrestris* realizado por Günther & Greven (1990), em que o número de células

epidérmicas aumentou em poucos dias com o “stress” ambiental resultante da exposição aos metais Cd e Pb.



**Figura 14:** Fluxograma indicativo das respostas estruturais resultantes do aumento da espessura da epiderme.

Por outro lado, numa situação de exposição crónica (ao fim de 56 dias), esta resposta estrutural não se mantém, verificando-se que a espessura da epiderme das minhocas expostas aos solos experimentais é similar à do grupo LUFA (controlo), pelo que parece haver uma adaptação dos organismos a estes solos. No entanto, à semelhança do solo T7 SEMI, no solo T56 SEMI, observa-se uma resposta funcional através do aumento da secreção de mucopolissacáridos ácidos (AB-positivo). Este tipo de secreção é composto por glicosaminoglicanos sulfatados, possíveis candidatos na retenção de iões de metais pesados (Cinar *et al.*, 2014). Assim, a secreção de mucopolissacáridos ácidos funciona como barreira iónica e defesa química face aos metais pesados, devido à sua capacidade seletiva e tamponante (Cinar *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). É efetivamente uma explicação viável, uma vez que é neste tipo de solo (semi-natural) onde se encontra uma maior concentração de metais pesados, e por isso haver um resposta funcional através da secreção de mucopolissacáridos ácidos face a um ambiente com elementos potencialmente tóxicos.

## 6. Conclusões

A utilização destes biomarcadores (espessuras de epitélio e da cutícula, e atividade secretora do epitélio tegumentar) permitiu avaliar respostas estruturais e funcionais de *E. fetida* face à exposição a solos provenientes de diferentes tipos de pastagens. A resposta estrutural (avaliada pelas alterações da espessura do epitélio e da cutícula), constitui uma resposta rápida, enquanto que a resposta funcional, determinada pelas alterações na atividade secretora, constitui uma resposta lenta.

No que diz respeito à avaliação ecotoxicológica, os solos com maior manuseio agrícola (maior exposição a agroquímicos), permanente (EXT) e intensivo (INT), demonstraram ser menos prejudiciais para *E. fetida* comparativamente ao solo semi-natural (SEMI). Embora paradoxal, este resultado pode ser explicado pelas diferenças observadas nas propriedades físico-químicas dos solos experimentais: apesar de existirem metais pesados nos diferentes tipos de solo, o menor teor de matéria orgânica do solo SEMI terá contribuído para a maior biodisponibilidade de PTEs para os organismos do solo. Nos solos em que há ação humana (manuseio agrícola), para além da aplicação de agroquímicos (que apontam um impacto negativo nos solos), há simultaneamente a aplicação de corretivos nos solos e de matéria orgânica a fim de melhorar as suas propriedades físico-químicas e fertilidade, o que eventualmente protege os organismos que neles se encontram da excessiva carga metálica originada pela aplicação de agroquímicos.

Em suma, este trabalho não só destaca a importância da monitorização das propriedades físico-químicas dos solos, como também alerta para a pertinência em implementar planos de biomonitorização numa abordagem ecotoxicológica, que possam contribuir com medidas mitigadoras de efeitos ecotoxicológicos expressos em níveis biológicos superiores (como animais residentes nestes locais e plantas) e assim tornar uma produção de alimentos sustentável e de qualidade, salvaguardando a saúde ambiental e humana.

## 7. Referências Bibliográficas

- Ahmed, S. T. (2013). The impact of four pesticides on the earthworm *Lumbricus terrestris* (Annelida; Oligochaeta). *International Journal of Current Research and Review*, 5(21), 1.
- Amaral, A., Soto, M., Cunha, R., Marigómez, I., & Rodrigues, A. (2006). Bioavailability and cellular effects of metals on *Lumbricus terrestris* inhabiting volcanic soils. *Environmental Pollution*, 142(1), 103-108.
- Booth, L. H., & O'Halloran, K. (2001). A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to the organophosphorus insecticides diazinon and chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(11), 2494-2502.
- Brallier, S., Harrison, R. B., Henry, C. L., & Dongsen, X. (1996). Liming effects on availability of Cd, Cu, Ni and Zn in a soil amended with sewage sludge 16 years previously. *Water, Air, and Soil Pollution*, 86(1-4), 195-206.
- Briones, M. J. I., & Álvarez-Otero, R. (2018). Body wall thickness as a potential functional trait for assigning earthworm species to ecological categories. *Pedobiologia*, 67, 26-34.
- Cinar, K., Öztop, M., & Demirbağ, E. (2014). The Histochemical Characterization of the Glycoconjugates in the Epidermal Mucous Cells of the Red Californian Earthworm, *Eisenia foetida*. *Journal of Histology*, 2014.
- Coggeshall, R. E. (1966). A fine structural analysis of the epidermis of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *The Journal of cell biology*, 28(1), 95-108.
- Costa, L. G., Giordano, G., Guizzetti, M., & Vitalone, A. (2008). Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Front Biosci*, 13(4), 1240-1249.
- Cruz, J. V., Pereira, R., & Moreira, A. (2007). Carta de Ocupação do Solo da Região Autónoma dos Açores (Report), Secretaria Regional do Ambiente e do Mar, Direcção Regional do Ordenamento do Território e dos Recursos Hídricos, Consultado em :<http://www.azores.gov.pt/NR/rdonlyres/730FD13F-9AEE-4C6A-A2DA-4226FC77DCE0/388321/COSRAARELATORIO.pdf>
- Cunha, L., Campos, I., Montiel, R., Rodrigues, A., & Morgan, A. J. (2011). Morphometry of the epidermis of an invasive megascoelecid earthworm (*Amyntas gracilis*, Kinberg 1867)

- inhabiting actively volcanic soils in the Azores archipelago. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(1), 25-32.
- Datta, S., Singh, J., Singh, S., & Singh, J. (2016). Earthworms, pesticides and sustainable agriculture: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(9), 8227-8243.
- Doran, J.W., & Parkin, T.B. (1994). Defining and assessing soil quality. p. 3-21. In: J.W. Doran et al., (ed.) *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. SSSA Spec. Publ. No. 35, Soil Sci. Soc. Am., Inc. and Am. Soc. Agron., Inc., Madison, WI.
- Edwards, C. A., & Bohlen, P. J. (1996). *Biology and ecology of earthworms* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
- Günther, A., & Greven, H. (1990). Increase of the number of epidermal gland cells—an unspecific response of *Lumbricus terrestris* (Lumbricidae: Oligochaeta) to different environmental stressors. *Zoologischer Anzeiger*, 225(5-6), 278-286.
- Kennette, D., Hendershot, W., Tomlin, A., & Sauvé, S. (2002). Uptake of trace metals by the earthworm *Lumbricus terrestris* in urban contaminated soils. *Applied soil ecology*, 19(2), 191-198.
- Kılıç, G. A. (2011). Histopathological and biochemical alterations of the earthworm (*Lumbricus terrestris*) as biomarker of soil pollution along Porsuk River Basin (Turkey). *Chemosphere*, 83(8), 1175-1180.
- Licata, A., Ainis, L., Martella, S., Ricca, M. B., Licata, P., Lauriano, E. R., & Zaccone, G. (2002). Immunohistochemical localization of nNOS in the skin and nerve fibers of the earthworm *Lumbricus terrestris* (Annelida Oligochaeta). *Acta histochemica*, 104(3), 289-295.
- LNEC (1967a). Solos. Teor em Matéria Orgânica. Documentação normativa (Especificação NEC E201). Laboratório Nacional de Engenharia Civil.
- LNEC (1967b). Solos. Deterinação do pH. Documentação normativa (Especificação NEC E203). Laboratório Nacional de Engenharia Civil.
- Mastrodonato, M., Lepore, E., Gherardi, M., Zizza, S., Sciscioli, M., & Ferri, D. (2005). Histochemical and ultrastructural analysis of the epidermal gland cells of *Branchiomma luctuosum* (Polychaeta, Sabellidae). *Invertebrate Biology*, 124(4), 303-309.
- McCaughey, A., Jones, C., & Jacobsen, J. (2009). Soil pH and organic matter. *Nutrient management module*, 8, 1-12.

- Morris, G. M. (1985). Secretory cells in the clitellar epithelium of *Eisenia foetida* (Annelida, Oligochaeta): a histochemical and ultrastructural study. *Journal of morphology*, 185(1), 89-100.
- Neuhauser, E. F., Loehr, R. C., Milligan, D. L., & Malecki, M. R. (1985). Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia fetida*. *Biology and Fertility of Soils*, 1(3), 149-152.
- Oliver, D. P., Tiller, K. G., Conyers, M. K., Slattery, W. J., Alston, A. M., & Merry, R. H. (1996). Effectiveness of liming to minimise uptake of cadmium by wheat and barley grain grown in the field. *Australian Journal of Agricultural Research*, 47(7), 1181-1193.
- Pacheco, J. M., Ferreira, T., Queiroz, G., Wallenstein, N., Coutinho, R., Cruz, & Goulart, C. (2013). Notas sobre a geologia do arquipélago dos Açores. In R. Dias, A. Araújo, P. Terrinha, & J. C. Kullberg (Eds.), *Geologia de Portugal* (pp. 595–690). Lisboa: Escolar Editora.
- Papini, S., & Andréa, M. M. (2004). Ação de minhocas *Eisenia foetida* sobre a dissipação dos herbicidas simazina e paraquat aplicados no solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 28(1).
- Parelho, Carolina Paula Furtado de Medeiros. "Biomonitoring soil health in agricultural volcanic areas: an integrative approach". (Tese de Doutorado em Biologia). Ponta Delgada: Universidade dos Açores, 2016.
- Roubalová, R., Procházková, P., Dvořák, J., Škanta, F., & Bilej, M. (2015). The role of earthworm defense mechanisms in ecotoxicity studies. *Invertebrate Survival Journal*, 12(1), 203-213.
- Sharma, S., Pradhan, K., Satya, S., & Vasudevan, P. (2005). Potentiality of earthworms for waste management and in other uses—A review. *The Journal of American Science*, 1(1), 4-16.
- Sivakumar, S. (2015). Effects of metals on earthworm life cycles: a review. *Environmental monitoring and assessment*, 187(8), 530.
- Souza, V. L., Lima, V. L., Hazin, C. A., Fonseca, C. K., & Santos, S. O. (2015). Biodisponibilidade de metais-traço em sedimentos: uma revisão. *Brazilian Journal of Radiation Sciences*, 3(1A).
- Steffen, Gersa Pauli Kist, Antonioli, Zaida Inês, Steffen, Ricardo Bemfica, & Jacques, Rodrigo Josemar Seminoti. (2013). Importância ecológica e ambiental das minhocas. *Revista de Ciências Agrárias*, 36(2), 137-147.
- Steffan, J. J., Brevik, E. C., Burgess, L. C., & Cerdà, A. (2018). The effect of soil on human health: an overview. *European journal of soil science*, 69(1), 159-171.

- Usman, A.R.A., Kuzyakov, Y. & Stahr, K., (2008). Sorption, desorption, and immobilization of heavy metals by artificial soil. MSc. thesis, University of Hohenheim, Stuttgart.
- Wang, C., Sun, Z., Zheng, D., & Liu, X. (2011). Function of mucilaginous secretions in the antibacterial immunity system of *Eisenia fetida*. *Pedobiologia*, 54, S57-S62.
- Wen, B., Hu, X. Y., Liu, Y., Wang, W. S., Feng, M. H., & Shan, X. Q. (2004). The role of earthworms (*Eisenia fetida*) in influencing bioavailability of heavy metals in soils. *Biology and Fertility of Soils*, 40(3), 181-187.
- Yasmin, S., & D'Souza, D. (2007). Effect of pesticides on the reproductive output of *Eisenia fetida*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 79(5), 529-532.
- Zeng, F., Ali, S., Zhang, H., Ouyang, Y., Qiu, B., Wu, F., & Zhang, G. (2011). The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants. *Environmental pollution*, 159(1), 84-91.
- Zhang, F., Li, Y., Yang, M., & Li, W. (2012). Content of heavy metals in animal feeds and manures from farms of different scales in northeast China. *International journal of environmental research and public health*, 9(8), 2658-2668.
- Zhang, D., Chen, Y., Ma, Y., Guo, L., Sun, J., & Tong, J. (2015). Earthworm epidermal mucus: Rheological behavior reveals drag-reducing characteristics in soil. *Soil and Tillage Research*, 158, 57-66.

## 8. Anexos

### Anexo 1 - Preparação dos reagentes Ácido Periódico-Schiff (Bancroft, 2006)

1. Para cada coloração, dissolveu-se 2 g de ácido periódico para 400 mL de água destilada e guardou-se no frigorífico.
2. Para a preparação do reagente de Schiff, aos 400 mL de água destilada, adicionou-se 2 g de pararosanilina base, quando começou a ferver.
3. Passados 30 minutos, adicionou-se 4 g de metabissulfato de sódio, quando a temperatura desceu aos 60°C, e esperou-se 30 minutos.
4. De seguida, adicionou-se 4 mL ácido clorídrico concentrado, a temperatura ambiente.
5. Guardou-se num local escuro durante a noite.
6. No dia seguinte, adicionou-se o carvão ativado e agitou-se durante 1 hora.
7. Procedeu-se à filtração com filtro de pregas.

### Preparação do reagente Azul de Alcian

1. Aos 400 mL de água destilada, adicionou-se 12 mL de ácido acético (glacial).
2. Em seguida, ajustou-se o reagente azul de alcian a pH 2.5.
3. Adicionou-se 4 g de azul de alcian e procedeu-se à filtração com filtro de pregas (Figura 16).



Figura 15 – Filtração do Azul de Alcian com filtro de pregas.

### Procedimento da Coloração PAS – Azul de Alcian (PAS-AB 2.5)

Passo	Reagente	Duração (min.)
1	Xilol I	10
2	Xilol II	10
3	Álcool absoluto I	2
4	Álcool absoluto II	2
5	Álcool 96%	2
6	Álcool 70%	2
7	Água destilada	2
8	Azul de Alcian	15
9	Água corrente	2
10	Ácido Periódico	5
11	Água destilada	-
12	Reagente Schiff	10
13	Água Corrente	5
14	Álcool 96%	2
15	Álcool 100%	2
16	Álcool 100%	2
17	Xilol I	2



Figura 16 – Procedimento de coloração.

**UNIVERSIDADE DOS AÇORES**  
**Faculdade de Ciências e Tecnologia**

Rua da Mãe de Deus  
9500-321 Ponta Delgada  
Açores, Portugal