

UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM *Eisenia foetida* (OLIGOCHAETA) PARA ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE

Sandro Moreira Tuerlinckx¹; Tânia Beatriz Gamboa Araujo Morselli²; Ana Cláudia Kalil Huber³.

Prof. Dr. INTEC/CCS/URCAMP, Bagé/RS. Email: sandrotuerlinckx@urcamp.edu.br; Prof^a. Dr^a. Departamento de Solos, FAEM/UFPel, Pelotas, RS; Prof^a. Dr^a. INTEC/CCEA/URCAMP, Bagé, RS.

RESUMO: A entrada de metais pesados e agrotóxicos no solo pode resultar em alterações bioquímicas nos organismos vivos. Neste contexto, as minhocas têm sido estudadas como uma espécie teste de fácil manutenção e baixo custo, prontamente disponíveis para a avaliação da poluição química. O objetivo deste trabalho foi fornecer dados básicos sobre os biomarcadores bioquímicos do anelídeo *Eisenia foetida*. Os métodos para medição de cinco enzimas- aspartato aminotransferase (AST), amilase (AMIL), fosfatase alcalina (FALC), acetilcolinesterase (AChE) e da glutatona-S-transferase (GST) foram otimizados. Além disso, o ensaio oxidação do íon ferroso/laranja de xilenol (FOX) foi adaptado para mensurar os níveis de hidroperóxidos lipídicos (LPO) em tecidos de *Eisenia foetida*. As atividades da AST, AMIL e FALC foram comparativamente mais elevadas ($P < 0,05$) do que a AChE e GST em minhocas sob condições de laboratório. As *Eisenia foetida* na presença do fluido celomático (CF) apresentaram maiores níveis de LPO em comparação com minhocas na ausência de CF. Através dos dados analisados foi verificado que as minhocas da espécie *Eisenia foetida* mantidas em uma cultura padronizada apresentam atividade das enzimas estudadas e níveis de hidroperóxidos e que os resultados são reproduzíveis sob as condições de ensaio em estudo.
Palavras-chave: enzimas, hidroperóxidos lipídicos, minhocas, toxicologia.

USE OF BIOCHEMICAL BIOMARKERS IN *Eisenia foetida* (Oligochaeta) FOR ECOTOXICITY ASSAYS

ABSTRACT: The input of heavy metals and agrochemicals in the soil compartment can result in biochemical changes for living organisms. In this context, earthworms have been studied as a readily available, easily maintainable and cheap test species for assessing chemical pollution. The aim of this work was to provide basic data on the biochemical biomarkers in the annelid *Eisenia foetida*. Methods for measurement of five enzymes— aspartate aminotransferase (AST), amylase (AMIL), alkaline phosphatase (FALC), acetylcholinesterase (AChE) and of glutathione-S-transferase (GST) were optimized. In addition, the ferrous oxidation/xylene orange (FOX) assay was adapted to measure lipid hydroperoxides levels (LPO) in *Eisenia foetida* tissues. The activities of AST, AMIL and FALC are comparatively higher ($P < 0.05$) than AChE and GST in earthworms under laboratory conditions. The *Eisenia foetida* in the presence of coelomic fluid (CF) showed the highest LPO levels compared with earthworms in the absence of CF. Through the analyzed data it was verified that the earthworms *Eisenia foetida* species kept in a standardized culture present activity of enzymes and hydroperoxide levels and that the results are reproducible under our test conditions.
Keywords: enzymes, lipid hydroperoxides, earthworms, toxicology.

INTRODUÇÃO

Minhocas agem como engenheiros de ecossistemas atuando em processos que ocorrem no solo, influenciando as propriedades físicas, químicas e biológicas. Elas são, portanto, organismos modelo usados em testes de toxicidade terrestre, possuindo aplicação destacada como indicadores de níveis de estresse e da sustentabilidade de ecossistemas (BUCKERFIELD et al., 1997; GORRES et al., 2001).

Entre as várias espécies de minhocas, a *Eisenia foetida* foi estabelecida como a mais comumente empregada para a padronização de ensaios de ecotoxicidade (OECD 1984, ISO 1993), pois podem ser facilmente cultivadas em laboratório e são sensíveis a uma vasta gama de produtos tóxicos (LOWE e BUTT, 2007; YASMIN e D'SOUZA, 2007).

Neste sentido, a utilização de marcadores bioquímicos neste organismo tem sido empregada nos últimos anos para investigar contaminantes e seus potenciais de toxicidade, metabolização ou detoxificação, principalmente como uma ferramenta para o monitoramento ambiental (REINECKE e REINECKE, 2007; RIZWAN-UL-HAQ et al., 2012; VELKI e HACKENBERGER, 2013). Entre os biomarcadores disponíveis, a atividade da acetilcolinesterase é amplamente usada para monitorar especificamente os efeitos de agentes anticolinesterásicos (RAO et al., 2003; GAMBI et al., 2007) e atualmente, já está caracterizada para diversas espécies de minhocas (CASELLI et al., 2006; RAULT et al., 2007).

Enzimas pertencentes as vias de detoxificação celular também são especialmente utilizadas para detectar toxicidade em diferentes ambientes (SHEEHAN et al., 2001). Dentro desta classe, destacam-se as glutatona-S-transferases, envolvidas na eliminação de compostos citotóxicos e genotóxicos e na prevenção de danos oxidativos aos tecidos (FROVA 2006; ALY e SCHRODER, 2008; LACOURSE et al., 2009; LANNUTTI et al., 2012). As características bioquímicas destas enzimas em minhocas da espécie *Eisenia foetida* foram demonstradas em estudos desenvolvidos por Borgeraas et al. (1996) e Saint-Denis et al. (1998).

Metabolicamente, as minhocas pertencentes ao filo Annelida são estruturadas para hidrolisar carboidratos (PRATT et al., 2002). Particularmente, em *Eisenia foetida* foram caracterizadas e purificadas duas enzimas digestivas do tipo α -amilases (UEDA et al., 2008).

Da mesma forma, a fosfatase alcalina, envolvida na hidrólise de ésteres de monofosfatos orgânicos, foi descrita por Park et al. (1998) no intestino de espécies do gênero *Eisenia*.

As aminotransferases são enzimas que possuem um importante papel no metabolismo do nitrogênio em diversas espécies, pois catalisam a primeira etapa no catabolismo de aminoácidos e direcionam a excreção do nitrogênio na forma de amônia e uréia (CAMPBELL e FARRELL, 2009). Além disso, as minhocas excretam o nitrogênio oriundo de seu metabolismo na forma de uréia e amônia, entretanto, até o presente momento, são raros os trabalhos que demonstram a atividade das aminotransferases em oligoquetas (SCAPSet al., 1997; WHALEN et al., 2000).

Os ensaios de lipoperoxidação (LPO) que quantificam os níveis de hidroperóxidos lipídicos servem como biomarcadores do estresse oxidativo em organismos expostos à substâncias químicas diversas, produtos tóxicos e a estressores ambientais (BOU et al., 2008).

De acordo com Jiang et al. (1991) o ensaio FOX é baseado na oxidação do Fe^{2+} por hidroperóxidos lipídicos em condições ácidas, sendo, então, complexado com o alaranjado de xilenol e adaptado para extratos de tecidos heterogêneos de animais endotérmicos mostrou ser um método rápido e preciso para medir a lipoperoxidação (HERMES-LIMA et al., 1995). Também foi demonstrado que a aplicação do ensaio FOX é adequado e rápido como um método de detecção da lipoperoxidação em tecidos de invertebrados (MONSERRAT et al., 2003). Embora o método FOX seja amplamente utilizado com a finalidade de avaliar a lipoperoxidação nos mais diversos sistemas biológicos (GAY e GEBICKI, 2003; BOU et al., 2008), não há relatos na literatura sobre o emprego deste ensaio na oligoqueta *Eisenia foetida*.

Deve-se distinguir a resposta normal de um organismo para manter a sua homeostase de uma resposta do organismo estressado ou adversamente afetado (CALZOLAI et al., 2007). Assim, é necessária uma investigação experimental sobre o perfil de variação da expressão do biomarcador não relacionada aos contaminantes (JANSEN et al., 2006; WENK e FERNANDIS, 2007).

Neste sentido, a manutenção das minhocas antes da instalação de um teste de toxicidade é de fundamental importância, necessitando de uma adequada padronização, pois as atividades enzimáticas em minhocas são influenciadas pelo estado fisiológico, idade e tipo de substrato (PRABHA et al., 2007; RODRIGUEZ-CASTELLANOS e SANCHEZ-HERNANDEZ, 2007). Portanto, diversos protocolos (OECD, 2004; ABNT, 2007; ISO, 2008) são recomendados para a manutenção das culturas em laboratório.

Até o momento, poucos trabalhos foram realizados no Brasil utilizando enzimas ou hidroperóxidos lipídicos como marcadores bioquímicos envolvendo a *Eisenia foetida* como organismo bioindicador. Assim, o objetivo do presente estudo foi aplicar metodologias enzimáticas e de níveis de hidroperóxidos, por intermédio de um analisador bioquímico de semiautomação, para minhocas da espécie *Eisenia foetida* mantidas em cultivo com substrato padronizado em laboratório.

MATERIAIS E MÉTODOS

Organismos teste e manutenção da cultura

A escolha do organismo teste, as condições para a sua manutenção no laboratório, e os requisitos para a sua utilização nos ensaios foram baseados em protocolos estabelecidos na literatura (OECD 2004, ISO 2008, NUNES e ESPÍNDOLA, 2012).

Lotes de minhocas *Eisenia foetida* (Lumbricidae, Annelida) foram obtidas a partir do Minhocário da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL – Pelotas/RS) e posteriormente multiplicadas no minhocário da Universidade da Região da Campanha (URCAMP – Bagé/RS). Então, foram selecionadas 100 minhocas adultas e com clitelo desenvolvido para dar início a uma cultura colocada em substrato de manutenção no Laboratório de Marcadores Bioquímicos – INTEC/URCAMP – Bagé/RS, Brasil.

O substrato de manutenção foi constituído de pó de fibra de coco e esterco bovino seco a 110⁰ C (50:50 v/v) em estufa modelo Orion 515 – FANEM/SP. A mistura foi colocada em caixas de material plástico resistente, com capacidade para 1000g do substrato seco e acrescido de água destilada para atingir 70% de umidade.

A fibra de coco utilizada foi o substrato pó, adquirido da empresa Projeto Coco Verde, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Antes da utilização, o substrato pó foi sujeito a desfaunização mediante a aplicação de pelo menos dois ciclos de congelamento e descongelamento de 48 h.

O pH do substrato de manutenção foi ajustado e monitorado regularmente para $6,5 \pm 0,5$ por adição suficiente de CaCO_3 quando necessário. A umidade foi ajustada e monitorada visualmente uma vez por semana. Os organismos foram alimentados quinzenalmente com uma dieta suplementada com farinha de aveia pré-cozida em água destilada.

Então, a cultura foi mantida a $20 \pm 2^\circ \text{C}$ sob condições padronizadas de temperatura ($20^\circ \pm 2^\circ\text{C}$), em ciclo 12 h luz/12 h escuro com intensidade luminosa de 400–800 *lux* e umidade de 75% em câmara climatizada modelo 347 CDG – FANEM/SP.

As minhocas utilizadas nos experimentos foram adultas com clitelo desenvolvido, obtidas a partir da cultura padronizada, com pelo menos três meses de idade, mas não mais que um ano e com pesos individuais variando entre 300 e 600 mg.

Avaliações enzimáticas na *Eisenia foetida*

Preparo das amostras

Antes da realização das análises bioquímicas, as minhocas foram retiradas do substrato de manutenção 24 h antes do início dos testes, selecionadas e armazenadas em placas de Petri sobre papel filtro Whatman nº 1 umedecido, sob temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ com luz 12:12 h: ciclo claro-escuro, para esvaziamento do conteúdo do trato digestório (REINECKE e REINECKE, 2008) no Laboratório de Marcadores Bioquímicos – INTEC/URCAMP-Bagé, RS.

Posteriormente, as minhocas ($n = 20$) foram individualmente homogeneizadas em tampão Tris-HCl ($0,1 \text{ Mol L}^{-1}$, pH 7,6) em quatro partes (4:1 peso:volume), contendo fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF; $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) como inibidor de proteases, usando um homogeneizador de tecidos *Heidolph* a 6.000 rpm. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 3.000 g por 30 min em uma centrífuga Coleman modelo 90-1, resultando em um sobrenadante (S1) que foi utilizado para a medição das atividades enzimáticas. Todos os preparos teciduais foram realizados a 4°C .

Avaliação da enzima acetilcolinesterase

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi medida conforme o método de Ellman et al. (1961) e adaptada para uso em minhocas. Para este teste, o iodeto de acetiltiocolina foi usado como substrato e o ácido 5,5' ditio-bis-2-nitrobenzoato (DTNB) como cromógeno. Na reação o iodeto de acetiltiocolina é hidrolisado pela colinesterase, liberando tiocolina, a qual

reage com o DTNB para produzir um ânion amarelo que pode ser detectado espectrofotometricamente a 412 nm.

A atividade enzimática, foi então mensurada cineticamente, utilizando-se no ensaio 1000 μL de tampão fosfato ($0,1 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,0), 50 μL de DTNB ($0,01 \text{ molL}^{-1}$), 50 μL de sobrenadante (S1) de minhoca em diferentes diluições e 50 μL de iodeto de acetiltiocolina ($0,01 \text{ molL}^{-1}$) adicionados sucessivamente. A reação foi realizada a 25°C e iniciada pela adição do substrato.

Efetuuou-se a leitura de absorbância em λ 412 nm aos 30; 60; 90 e 120 segundos e verificou-se a linearidade do aumento da absorbância em função do tempo. A atividade da acetilcolinesterase foi expressa em $\mu\text{moles mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Avaliação da enzima glutationa-S-transferase

A glutationa-S-transferase (GST) foi avaliada usando o CDNB como substrato para a medição espectrofotométrica em 340nm a 25°C , de acordo com Habig et al. (1974). A atividade enzimática, foi então mensurada utilizando-se no ensaio 960 μL de tampão Tris ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7), 10 μL de CDNB (100 mmol L^{-1}), 10 μL de glutationa (GSH, 100 mmolL^{-1}) e 20 μL do sobrenadante de minhoca foram adicionados sucessivamente. A reação foi iniciada pela adição de GSH.

Uma unidade da GST foi calculada como μmol de CDNB conjugado por mg de proteína ($\text{U mg}^{-1} \text{ proteína}$), usando o coeficiente de extinção molar de $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A atividade enzimática foi então expressa em Unidades de GST/mg proteínas.

Avaliação da enzima α -amilase

Este método baseia-se na utilização do substrato GalG2-CNP (2-cloro-4-nitrofenil-galacto-piranosil maltodiose) que é diretamente hidrolisado pela enzima α – amilase da amostra produzindo cloronitrofenol (CNP), conforme descrito por Winn-Deen et al. (1988). O CNP absorve luz em 405 nm, e a velocidade de aparecimento da cor é diretamente proporcional à atividade enzimática.

Para o ensaio adicionou-se 1000 μL do reagente contendo Tampão biológico pH 6,00 - 50 mmol L^{-1} ; Cloreto de sódio - 70 mmolL^{-1} ; Cloreto de Cálcio 6 mmol L^{-1} ; GalG2-CNP $2,22 \text{ mmol L}^{-1}$ em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 20 μL de diferentes diluições

da amostra realizando-se a leitura a 37 °C. A atividade da enzima α -amilase foi expressa como $\mu\text{mol CNP mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$. O teste foi conduzido utilizando-se kit bioquímico da Biotécnica Ltda.

Avaliação da enzima fosfatase alcalina

Neste método, o *p*-nitrofenilfosfato (*p*NP) é hidrolisado especificamente pela fosfatase alcalina em pH 9,8, liberando o *p*-nitrofenol (PNF), cuja velocidade de formação, medida em 405 nm, é proporcional à atividade da enzima presente na amostra (TIETZ et al., 1983).

Adicionou-se 800 μL do reagente contendo dietanolamina 1 mmol L^{-1} pH 9,81; cloreto de magnésio 0,5 mmol L^{-1} e 200 μL do reagente *p*-nitrofenilfosfato 10 mmol L^{-1} em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 20 μL da amostra em diferentes diluições realizando-se a leitura a 37 °C. A atividade enzimática foi então mensurada cineticamente e expressa como $\mu\text{mol PNF mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$. O teste foi conduzido utilizando-se kit bioquímico da Biotécnica Ltda.

Avaliação da enzima aspartato aminotransferase

A enzima aspartato aminotransferase (AST) catalisa a transferência de grupos amino da alanina para o α -cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato. Este é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD^+ . A consequente redução da absorvância em 340 nm, monitorada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra (SCHUMANN et al., 2002).

Para a determinação da atividade enzimática na presença do piridoxal fosfato, pipetou-se em um tubo 800 μL do reagente contendo tampão TRIS 105 mmol L^{-1} ; L-aspartato 330 mmol L^{-1} ; malato desidrogenase (MDH) $\geq 825 \text{ U/L}$. Em seguida, adicionou-se 100 μL da amostra e incubou-se a 37°C durante 5 minutos. Após esse período de incubação, iniciou-se a medição cinética com a adição de 200 μL do reagente contendo tampão TRIS 20 mmol L^{-1} ; NADH 1320 $\mu\text{mol L}^{-1}$; α -cetoglutarato 66 mmol L^{-1} . A atividade enzimática foi mensurada cineticamente expressa como $\mu\text{mol NADH mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$. O teste foi conduzido utilizando-se kit bioquímico da Biotécnica Ltda.

Cálculos para obtenção das atividades enzimáticas:

Para todas as atividades enzimáticas os testes realizados foram ensaios cinéticos utilizando-se um analisador bioquímico de semiautomação termostatizado TP Analyzer - Thermoplate. Os resultados foram calculados utilizando-se um fator obtido em condições ótimas de reação que incluem comprimento de onda específico para cada enzima, cubeta termostatizada com 1,0 cm de espessura de solução, banda de passagem ≤ 2 nm e luz espúria $\leq 0,1\%$. Para a obtenção dos fatores, empregou-se o seguinte cálculo:

$$\mathbf{Fator = VT/VA \times \epsilon \times C}$$

Em que: **VT** = volume total no meio de reação, **VA** = volume da amostra; **ϵ** = Coeficiente de absorvidade milimolar específico do produto da reação da enzima analisada, que corresponde o quanto um composto absorve a luz em um dado comprimento de onda, num caminho óptico de 1 cm e na concentração de 1 mmol L⁻¹; e **C** = Caminho óptico da leitura no equipamento, em centímetros.

Com relação à enzima acetilcolinesterase, foi utilizado o $\epsilon_{412\text{nm}}$ para o ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) igual a $13,6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; para o ensaio da enzima glutationa-S-transferase foi empregado o ϵ para o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 9,6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); para a enzima α -amilase em $\epsilon_{405 \text{ nm}} = 13,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o 2-cloro-4-nitrofenil-galacto-piranosil maltodiose (GalG2-CNP); no caso da fosfatase alcalina, utilizou-se para o *p*-NitroFenilFosfato (*p*NPP, $\epsilon_{405 \text{ nm}} = 18,5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e para a enzima aspartato aminotransferase empregou-se para o NADH $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6,3 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Com o propósito de se obter as atividades enzimáticas específicas, efetuaram-se as leituras das absorbâncias, calculando-se a média da variação da absorbância por minuto ($\Delta A/\text{min}$) e multiplicando-se pelo fator obtido para cada enzima, de acordo com a seguinte equação: Unidades enzimáticas/mL = $\Delta A/\text{min} \times \text{fator}$

Então, as atividades enzimáticas específicas foram expressas da seguinte forma:

$$\text{AE } (\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}) = \frac{(\text{Unidades enzimáticas}) \times \text{FD}}{\text{mg proteínas}}$$

Em que: **AE** = atividade específica; **FD** = fator de diluição da amostra; e **mg proteínas** = concentração de proteínas na amostra em mg/mL.

Determinação de proteínas da amostra

O conteúdo de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976). O ensaio de Bradford baseia-se na ligação do corante *Coomassie blue-250* para proteína com aumento da absorvância em 550nm. A diluição das amostras de tecido foi necessária antes da análise (1:100). Assim, a quantidade de proteína pode ser estimada no sobrenadante (S1) de minhoca, por comparação com uma solução padrão de albumina de soro bovino (BSA). A determinação de proteínas da amostra foi utilizada para o cálculo das atividades enzimáticas. Todas as medições foram realizadas em triplicata.

Determinação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos (Ensaio FOX)

Para este teste, adaptou-se o ensaio FOX para o tecido corporal e líquido celomático de *Eisenia foetida*, estabelecendo o tempo de absorção do complexo cromógeno para cada volume de amostra e o tempo de incubação necessário para estabilizar a leitura, conforme determinado por Jiang et al., (1991), Hermes-Lima et al., (1995) e Monserrat et al., (2003).

É um método utilizado para se determinar a concentração de hidroperóxidos em amostras biológicas e que utiliza o alaranjado de xilenol, baseando-se no princípio de que os hidroperóxidos oxidam ferro II a ferro III, o qual reage com o alaranjado de xilenol, produzindo um cromóforo que tem absorção máxima em 560 nm (BOU et al., 2008).

As minhocas utilizadas neste teste foram adultas com clitelo desenvolvido, obtidas a partir da cultura padronizada. Então, elas foram retiradas do substrato de manutenção 24 h antes do início dos testes, selecionadas e armazenadas em placas de Petri sobre papel filtro úmido sob temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ com luz 12:12 h ciclo claro-escuro, para esvaziamento do conteúdo do trato digestório.

Para obter minhocas sem o fluído celomático, foram feitas três lavagens com dois mL de metanol (HPLC-UV) para cada organismo, até não ser mais possível observar a eliminação do celoma.

Individualmente, minhocas inteiras foram homogeneizadas (1:9 peso:volume) em 100% de metanol-HPLC gelado (5°C). Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 1.000 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante resultante utilizado para a medição dos

hidroperóxidos lipídicos. O protocolo para a determinação de LPO foi adaptado para um analisador bioquímico de semi-automação (*TP Analyzer* – Thermoplate), empregando 250 µl de FeSO₄ 1 mmol L⁻¹, 100 µl de H₂SO₄ 250 mmol L⁻¹, 100 µl de laranja de xilenol 1 mmol L⁻¹, e água deionizada para um volume de 900 µl. Diferentes volumes da amostra (25, 50, 75, ou 100 µl) de *E. foetida* foram adicionados e o volume final ajustado para 1000 µl. A absorvância (546 nm) foi registrada em tempos diferentes (0 a 180 min) até a estabilização.

Foram preparados brancos de reagente substituindo-se os extratos de tecidos por metanol e também brancos da amostra que são feitos pela substituição do FeSO₄ por H₂O deionizada (MONSERRAT et al., 2003).

Assim, para dar continuidade ao teste construiu-se uma curva de calibração com uma solução de H₂O₂ 10 mmol/L, obtendo-se, respectivamente, concentrações finais 50 µmol L⁻¹, 100 µmol L⁻¹, 250 µmol L⁻¹, 500 µmol L⁻¹ e 750 µmol L⁻¹ de hidroperóxidos em um volume total de 1 mL e realizou-se a leitura em analisador bioquímico *TP Analyzer* em λ 546 nm após a estabilização da reação.

O valor do branco de reagente foi utilizado como *reagent blank* para zerar o equipamento. Determinou-se então a diferença da concentração de hidroperóxidos da amostra e do branco da amostra expressando-se os resultados como equivalentes de hidroperóxidos de lipídios (como substâncias reativas ao FOX) por grama de peso do tecido, usando a seguinte fórmula:

$$\text{Hidroperóxidos g tecido}^{-1} = C_A - C_{BA} \times \left(\frac{VF}{VA \times HF} \right)$$

Em que: C_A = concentração da amostra obtida na curva de calibração, C_{BA} = concentração do branco da amostra obtida na curva de calibração, VF = correspondente ao volume total da reação, VA = correspondente ao volume da amostra utilizado na reação e HF = Fator de homogeneização relativo para o volume de metanol por grama de tecido.

Análise estatística

Os testes paramétricos foram precedidos por Shapiro-Wilk para distribuição normal e pelo teste de Levene para a homogeneidade das variâncias. Diferenças significativas nos níveis de hidroperóxidos e atividades enzimáticas específicas foram testadas pela análise de variância (ANOVA), seguidas pelo teste de Duncan quando necessário. As diferenças entre as atividades enzimáticas foram consideradas significantes à $P < 0,05$, utilizando-se o

programa IBM SPSS 20. A linearidade entre o tempo de incubação e a diluição das amostras foi verificada pela análise de regressão linear.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi avaliado a variabilidade de biomarcadores bioquímicos por intermédio de ensaios preconizados na literatura através de um sistema analítico de semiautomação em minhocas *Eisenia foetida* sem a presença de estressores químicos, mantidas em substrato e ambiente padronizado.

Os valores obtidos para os coeficientes de variação (c.v.) demonstrados na tabela 1 foram: 11,41% (ACHE), 19,97% (AMIL), 8,08% (AST), 19,04% (FALC), 14,27%(GST) e 7,88% (LPX).

Tabela 1. Estatística descritiva e teste de normalidade para os diferentes marcadores bioquímicos testados em minhocas *Eisenia foetida* ($n = 20$) mantidas em substrato padronizado.

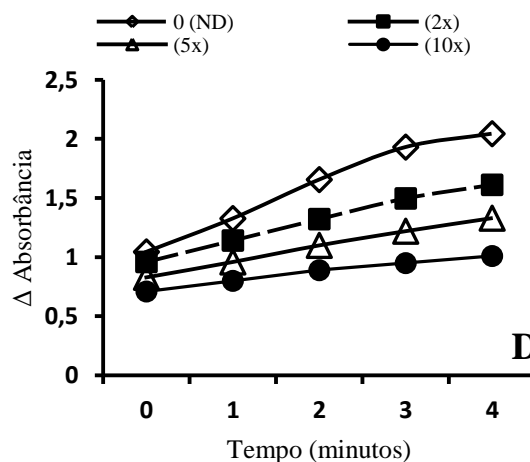
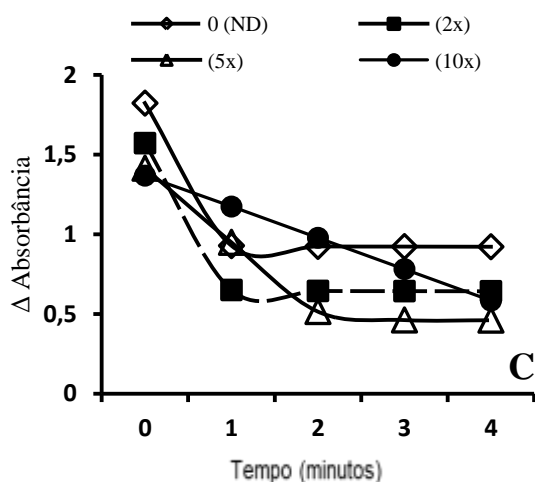
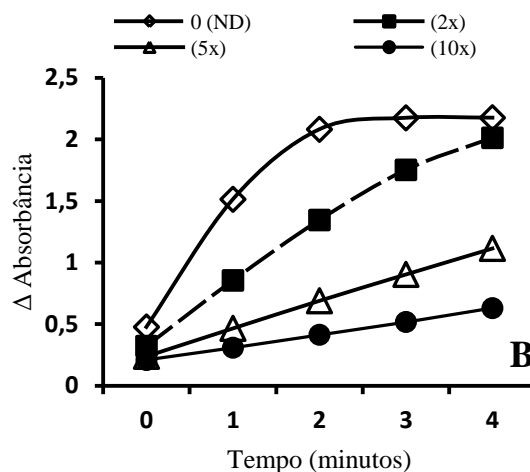
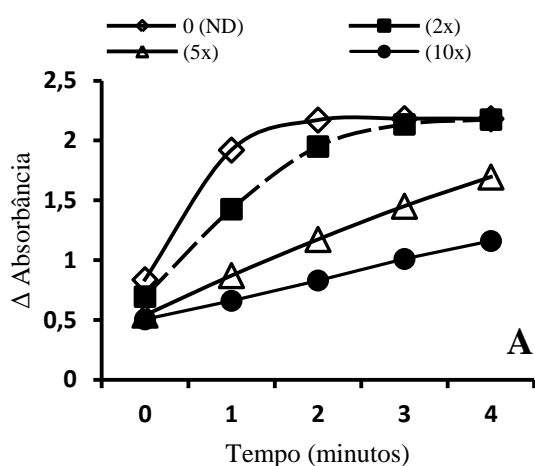
Marcadores bioquímicos	Média	(95%) Intervalo de confiança da média		Desvio padrão	Coeficiente de variação	Teste de normalidade
		Limite inferior	Limite superior			Shapiro-Wilk
ACHE	2,06	1,91	2,21	0,23	11,41%	0,980
AMIL	10,06	8,78	11,34	2,01	19,97%	0,035
AST	9,07	8,60	9,53	0,73	8,08%	0,412
FALC	8,59	7,56	9,64	1,64	19,04%	0,688
GST	1,09	0,99	1,19	0,15	14,27%	0,281
LPX	116	110,19	121,81	9,15	7,88%	0,993

ACHE: acetilcolinesterase; AMIL: amilase; AST: aspartato aminotransferase; FALC: fosfatase alcalina; GST: glutathione-S-transferase; LPX: lipoperoxidação.

A condição padronizada utilizada no teste em relação ao substrato, pH, luz, temperatura, alimentação, idade e peso dos organismos são fundamentais para que os resultados dos marcadores bioquímicos apresentassem distribuição normal dos dados ($P > 0,05$) e baixos coeficientes de variação (tabela 1), indicando que os ensaios possuem de boa a alta precisão.

Como pode ser observado nas figuras 1 (A – E) foi verificado uma relação linear entre os valores de absorbância (ABS) e a concentração de proteínas, com a finalidade de determinar a necessidade de diluição da amostra (S1) para cada enzima testada.

A diluição (10x) da amostra foi a que melhor apresentou linearidade para as enzimas AMIL ($y = 0,116 + 0,003*x; r^2 = 0,998$), AST ($y = 1,549 + 0,002*x; r^2 = 0,98$) e FALC ($y = 0,604 + 0,002*x; r^2 = 0,99$). Essa diluição da amostra corresponde a uma concentração de 30, 150 e 30 μg de proteínas mL^{-1} ($P < 0,0001$), respectivamente, enquanto que para a enzima ACHE a linearidade ($y = 0,946 + 0,002*x; r^2 = 0,99$) foi alcançada como uma diluição (5x), equivalente a 150 μg de proteínas mL^{-1} ($P < 0,0001$) e para a GST utilizou-se diretamente o S1, obtendo-se linearidade ($y = 0,563 + 0,001*x; r^2 = 0,991$) para o método ($P < 0,0001$) sem a necessidade de diluir a amostra (300 μg de proteínas mL^{-1}).



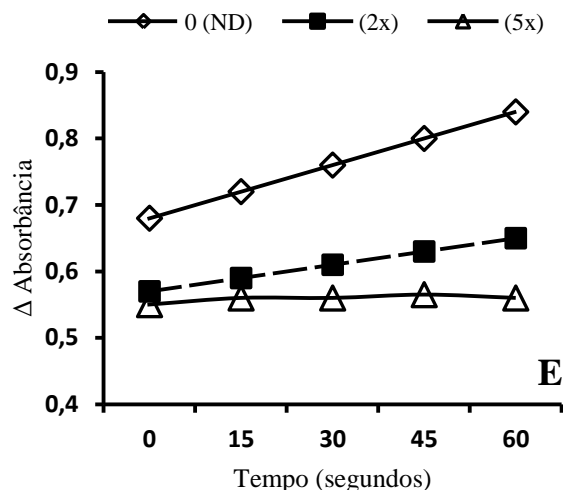


Figura 1: Linearidade de absorvância para as enzimas testadas de *Eisenia foetida* ($n = 20$) em diferentes tempos de incubação e volumes de diluição da amostra. (A) Fosfatase alcalina, (B) amilase, (C) aspartato aminotransferase, (D) acetilcolinesterase, (E) glutationa-S-transferase.

Outro marcador bioquímico investigado neste estudo foi o nível de hidroperóxidos lipídicos pelo teste do alaranjado de xilenol ou ensaio FOX.

Como pode-se observar na figura 2 os valores de absorvância (ABS) foram estabilizados após a incubação dos extratos metanólicos de *E. foetida* ($n = 12$) após 120 minutos de incubação à temperatura ambiente, sendo registrados valores de 0.134 ± 0.021 ; 0.325 ± 0.037 ; 0.551 ± 0.053 e 0.829 ± 0.062 para os volumes de amostra de 25 μl , 50 μl , 75 μl e 100 μl , respectivamente .

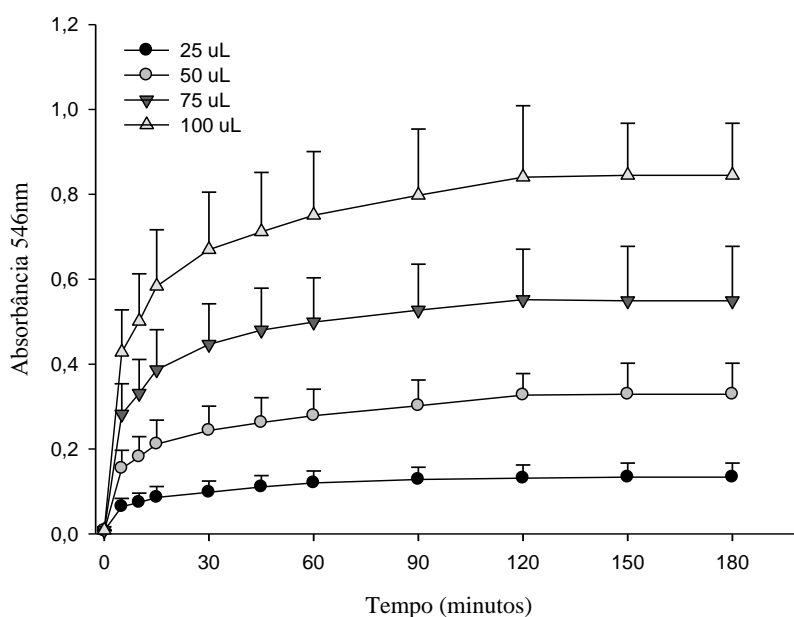


Figura 2. Incrementos na absorvância à 546 nm em diversos tempos de incubação e volumes da amostra para o ensaio de lipoperoxidação utilizando o método FOX. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão.

Sendo assim, procurou-se verificar também a influência da presença ou ausência do conteúdo celomático durante o processo de homogeneização sobre os níveis de hidroperóxidos da amostra.

Conforme os dados observados na figura 3, é possível concluir que em minhocas com a presença do fluido celomático há um elevado nível de hidroperóxidos ($P < 0,05$), se comparadas com as minhocas em que o líquido celomático foi extraído antes do processo de homogeneização.

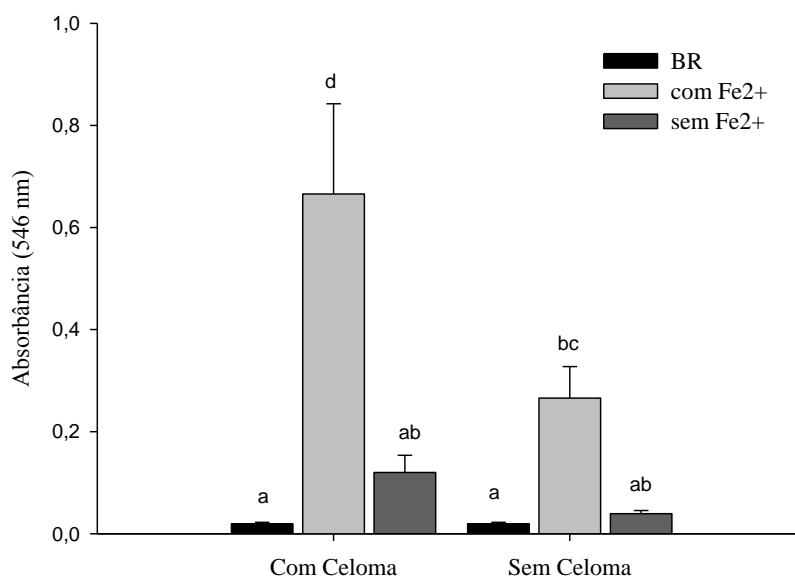


Figura 3. Valores de absorvância à 546 nm para o branco de reagente (BR), e amostras de *Eisenia foetida* com Fe²⁺ e sem Fe²⁺ (branco da amostra) nos ensaio de lipoperoxidação utilizando o método FOX. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão.

Para este experimento adotou-se uma curva de calibração com H₂O₂ como referência para calcular o nível de hidroperóxidos. Além disso, utilizou-se também o branco da amostra (sem Fe²⁺) para a correção da leitura, como sugerido por Monserrat et al. (2003).

O branco da amostra dos extratos de *E. foetida* emitiu um pequeno sinal, equivalente a 8,4% da leitura (figura 3) que deve ser subtraído do valor total com Fe²⁺ para a obtenção do valor real de hidroperóxidos. Na tabela 1 está demonstrado o valor do nível de hidroperóxidos após a aplicação do cálculo para um volume equivalente a 50 μ L da amostra (LPX = 116 \pm 9,15).

Experimentos de laboratório são necessários para examinar em que medida variáveis abióticas podem influenciar a flutuação normal de parâmetros bioquímicos em minhocas, particularmente para biomarcadores relacionados ao metabolismo de pesticidas. Estes estudos

mecanicistas fornecem indicações valiosas sobre interações sinérgicas entre os fatores ambientais e toxicidade de agentes químicos (RODRIGUEZ-CASTELLANOS e SANCHEZ-HERNANDEZ, 2007).

Os dados para os coeficientes de variação demonstrados na tabela 1, são comparativamente menores do que os obtidos em outro estudo para *D. magna* (8-33% ACHE e 17-32% GST) e para *P. scaber* (42% GST) (JEMEC et al., 2010).

Uma menor variabilidade enzimática ocorre em organismos geneticamente idênticos derivados de uma cultura clonada e que são mantidos sob condições laboratoriais padronizadas com um constante aporte de alimentos (JEMEC et al., 2010). Embora, neste experimento, não se tenha trabalhado com indivíduos clonados, estudos demonstram que ocorrem níveis muito baixos de diferenciação genética entre as populações de cada espécie de *Eisenia* (MCELROY e DIEHL, 2001; PÉREZ-LOSADA et al., 2005).

Quando o resultado obtido não está de acordo com o método analítico, uma causa provável pode ser uma elevada atividade enzimática com consumo excessivo de substrato na reação. Nestes casos, quando a absorbância final encontra-se no limite da capacidade dos testes é recomendável realizar uma diluição da amostra e conseqüentemente, utilizar o fator de diluição (FD) obtido para a correção do cálculo da atividade da enzima analisada (INFUSINO et al., 2010).

Neste estudo, foi demonstrado que a *Eisenia foetida* mantida nas condições de ensaio estabelecidas apresentou substancial atividade das enzimas estudadas, indicando que os resultados obtidos podem ser comparados aos achados na literatura para a acetilcolinesterase (CASELLI et al., 2006; RAULT et al., 2007), aspartato aminotransferase (SCAPS et al., 1997; MOSLEH et al., 2003), amilase (PRABHA et al., 2007; UEDA et al., 2008), fosfatase alcalina (PARK et al., 1996; PARK et al., 1998; PRABHA et al., 2007) e glutationa-S-transferase (SAINT-DENIS et al., 1998; ALY e SCHRODER, 2008; RIZWAN-UL-HAQ et al., 2012). Esse fato não é surpreendente, visto que, a *Eisenia foetida* possui uma alta capacidade de decompor a matéria orgânica oriunda de resíduos agrícolas (LOH et al., 2005; ANTONIOLLI et al., 2009) e industriais (RAVINDRAN et al., 2008; SINGH et al., 2010), por intermédio das transformações bioquímicas promovidas por enzimas presentes em seu trato digestório (PARK et al., 1998; PRABHA et al., 2007; UEDA et al., 2008).

Adicionalmente, relações entre as enzimas hidrolíticas, fosfatases, transaminases e transferases provêm fortes evidências envolvendo as alterações bioquímicas encontradas em minhocas e a contaminação do solo por pesticidas, as quais podem ser usadas como

bioindicadores (MOSLEH et al., 2003; RIZWAN-UL-HAQ et al., 2012; VELKI e HACKENBERGER 2013).

Após a padronização deste ensaio para invertebrados (MONSERRAT et al., 2003), diversos estudos foram conduzidos para avaliar as respostas oxidativas em populações de diferentes ecossistemas expostas a poluentes (GERACITANO et al., 2004; PINHO et al., 2005; VARGAS et al., 2010).

Embora o método FOX seja potencialmente útil em uma variedade de aplicações, seu uso requer um controle cuidadoso das condições utilizadas (BOU et al., 2008). Na verdade, a adaptação do ensaio FOX para os tecidos de invertebrados implica várias considerações metodológicas, incluindo o tempo de absorção do complexo cromógeno, que deve ser estabelecido para cada volume de amostra para determinar o tempo de incubação necessário para a estabilização da leitura (MONSERRAT et al., 2003).

Os resultados observados na figura 2 estão de acordo com os dados encontrados na literatura, no qual foi necessário um tempo de incubação entre 1 – 4 horas para estabilizar as leituras pelo ensaio FOX para amostras de diferentes espécies animais, inclusive de invertebrados (HERMES-LIMA et al., 1995; MONSERRAT et al., 2003).

Produtos derivados da lipoperoxidação possuem um efeito dual (NIKI, 2009). Desta forma os níveis de hidroperóxidos podem refletir danos teciduais que um determinado organismo pode sofrer, mas também podem indicar uma condição adaptativa, já que estas substâncias são formadas quando há uma ativação das células de defesa (DHAINAUT e SCAPS, 2001; COOPER e ROCH, 2003).

O resultado observado na figura 3 pode ser explicado pelos experimentos que demonstram a geração de formas reativas do metabolismo do oxigênio nas células celomáticas de *E. fetida* como um mecanismo de resposta contra patógenos e agentes estressores ambientais (VALEMBOIS e LASSÈGUES, 1995; XUE et al., 2009; ZHANG et al., 2009; WU et al., 2011).

O branco da amostra dos extratos de *E. fetida* emitiu um pequeno sinal, equivalente a 8,4% da leitura (figura 4). Resultados similares foram obtidos para extratos de poliquetas marinhas, em que o branco da amostra representa 6,8% do valor total do conteúdo de hidroperóxidos (MONSERRAT et al., 2003). Essas observações sustentam o fato de que a medida da absorbância do branco da amostra é altamente recomendada devido à influência de interferentes inespecíficos oriundos do tecido analisado (MONSERRAT et al., 2003; BOU et al., 2008).

CONCLUSÕES

Para a aplicação bem-sucedida dos biomarcadores é de fundamental importância entender suas propriedades intrínsecas, antes mesmo que o estudo de (eco) toxicidade seja projetado. O estado do organismo teste e as fontes de variabilidade de biomarcadores devem ser conhecidos e minimizados pela padronização tanto da cultura de manutenção como dos métodos analíticos utilizados.

Através dos dados analisados foi verificado que as minhocas da espécie *Eisenia foetidissima* em uma cultura padronizada apresentam atividade das enzimas estudadas e níveis de hidroperóxidos e que os resultados são reproduzíveis sob as condições do ensaio.

Conforme os resultados obtidos, é possível constatar que a avaliação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos representa uma metodologia confiável para a determinação da LPO em *Eisenia foetida*.

O uso de análises enzimáticas e do ensaio FOX neste organismo pelo sistema de espectrofotometria semiautomática podem ser adequados para investigações toxicológicas ou de adaptações metabólicas.

AGRADECIMENTOS

À Pró-Reitoria de Inovação, Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão – PROIPPEX (URCAMP/Bagé-RS) pelo financiamento do projeto e ao Departamento de Solos, FAEM/UFPel pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15537. Ecotoxicologia Terrestre – ecotoxicidade aguda: método de ensaio com minhocas. 2007, 11p.

ALY MA, SCHRODER P. Effect of herbicides on glutathione S-transferases in the earthworm, *Eisenia fetida*. Environmental Science Pollution Research International, 15: 143–149; 2008.

ANTONIOLLI Z. I., STEFFEN G.P.K, STEFFEN R. B.. Utilização de casca de arroz e esterco bovino como substrato para a multiplicação de *Eisenia fetida* Savigny (1826). Ciências e agrotecnologia, Lavras, v. 33, n. 3, p. 824-830, maio/jun., 2009

BORGERAAS J, NILSEN K, STRENSSEN J. Methods for purification of glutathione transferase in the earthworm genus *Eisenia* and their characterization. Comparative Biochemistry and Physiology C, Pharmacol Toxicol Endocrinol 114 (2) 129–140; 1996.

BOU R., CODONY R., TRES A., DECKER E. A., GUARDIOLA F. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation–xylenol orange method: A review of the factors that influence the method's performance. Analytical Biochemistry 377:1–15; 2008.

- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254; 1976.
- BUCKERFIELD, J. C. LEE K. E., DAVOREN C. W., HANNAY J. N. Earthworms as indicators of sustainable production in dryland cropping in southern Australia. *Soil Biology and Biochemistry* 29,(314) pp. W-554, 1997
- CALZOLAI L, ANSORGE W, CALABRESE E, DENSLOW N, PART P, LETTIERI T. Transcriptomics and proteomics. Applications to ecotoxicology. *Comp Biochem Physiol part D* 2:245–249; 2007.
- CAMPBELL M. K., FARRELL S. O. *Biochemistry, Sixth Edition*. Thomson Brooks/Cole. Canada, 2009,838p.
- CASELLI, F., GASTALDI, L., GAMBI, N., FABBRI, E. In vitro characterization of cholinesterases in the earthworm *Eisenia Andrei*. *Comparative Biochemistry and Physiology. C* 143, 416–421.; 2006.
- COOPER E L; ROCH P. Earthworm immunity: a model of immune competence. *Pedobiologia* 47, 676–688, 2003.
- DHAINAUT A; SCAPS P. Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Canadian Journal of Zoology*. 79: 233–253, 2001.
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES JR, V.V., FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7, 88–95.; 1961.
- FERNANDES J., AMORIM R., AZEVEDO I. MARTINS M.J. In vitro modulation of alkaline phosphatase activity of *Saccharomyces cerevisiae* grown in low or high phosphate medium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41: 41-46, 2008.
- FROVA C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomolecular Engineering*. 23: 149–169, 2006.
- GAMBI, N., PASTERIS, A., FABBRI, E. Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 145, 678–685.; 2007.
- GAO Y., SUN Z., LIU Y., SUN X., LI Y., BAO Y., WANG G. WANG G. Effect of albendazole anthelmintics on the enzyme activities of different tissue regions in *Eisenia fetida*. *European Journal of Soil Biology* 43:S246-S251, 2007.
- GAY C. A., GEBICKI J.M. Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric–xylenol orange method. *Analytical Biochemistry* 315 29–35; 2003.
- GERACITANO L. A., R. BOCCHETTI, J.M. MONSERRAT, F. REGOLI, A. BIANCHINI. Oxidative stress responses in two populations of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) after acute and chronic exposure to copper. *Marine Environmental Research* 58: 1–17, 2004.
- GORRES, J.H., SAVIN, M.C., AMADOR, J.A. Soil micropore structure and carbon mineralization in burrows and casts of an anecic earthworm (*Lumbricus terrestris*). *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1881–1887, 2001.
- HABIG WH, PABST MJ, JAKOBY WB. Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry* 249(22):7130–7139; 1974.
- HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology & Medicine*, 19: 271-280, 1995.
- INFUSINO I, SCHUMANN G, CERIOTTI F, PANTEGHINI M. Standardization in clinical enzymology: a challenge for the theory of metrological traceability. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. Mar;48(3):301-7, 2010.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Soil quality-effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*)—Part 1: determination of acute toxicity using soil substrate. ISO 11268-1. Genève, 1993.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Soil quality - avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour. Part 1—Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). ISO 17512-1. Genève, 2008.

JANSEN, R., G. SCHUMANN, H. BAADENHUIJSEN, P. FRANCK, C. FRANZINI, R. KRUSE, A. KUYPERS, C. WEYKAMP, AND M. PANTEGHINI. Trueness verification and traceability assessment results from commercial systems for measurement of six enzyme activities in serum. An international study in the EC4 framework of the Calibration 2000 project. *Clinica Chimica Acta* 368:160–167, 2006.

JEMEC A., DROBNE D., TIŠLER T., SEPČIĆ K. Biochemical biomarkers in environmental studies—lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environ Sci Pollut Res*, 17:571–581, 2010.

JIANG Z-Y, WOOLLARD ACS, WOLFF SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange—Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26:853–856; 1991.

KOZLENKOV A., MANES T., HOYLAERTS M. F., MILLAN J. L. Function Assignment to Conserved Residues in Mammalian Alkaline Phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 277, No. 25, pp. 22992–22999, 2002

LACOURSE E J, HERNANDEZ-VIADEL M, JEFFERIES J R, SVENDSEN C, SPURGEON D J., BARRETT J., MORGAN A J, KILLE P, BROPHY P M. Glutathione transferase (GST) as a candidate molecular-based biomarker for soil toxin exposure in the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Environmental Pollution* 157: 2459–2469; 2009

LANNUTTI, F., MARRONE A., NAZZARENO RE. Binding of GSH conjugates to π -GST: A cross-docking approach. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 32: 9-18, 2012.

LOH T.C., LEE Y.C., LIANG J.B., TAN D. Vermicomposting of cattle and goat manures by *Eisenia foetida* and their growth and reproduction performance. *Bioresource Technology* 96: 11–114; 2005.

LOWE C. N, BUTT N. R.. Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: A critical review. *European Journal of Soil Biology* 43: S281-S288; 2007.

MCELROY, T.C., DIEHL, W.J. Heterosis in two closely related species of earthworm (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). *Heredity* 87, 598–608, 2001.

MONSERRAT, J M.; GERATACIANO, L A.; PINHO, G L. L. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylenol orange complex formation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. New York, v. 45, n. 2, p.177-183, aug., 2003.

MOSLEH YY, ISMAIL SM, AHMED MT, AHMED YM. Comparative toxicity and biochemical responses of certain pesticides to the mature earthworm *Aporrectodea caliginosa* under laboratory conditions. *Environmental Toxicology*. Oct;18(5):338-46, 2003.

NIKI E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology & Medicine* 47: 469–484, 2009.

NUNES M. E. T., ESPÍNDOLA E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. *Ecotoxicology* DOI 10.1007/s10646-012-0859-6, 2012.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline for testing of chemicals n. 207—Earthworm acute toxicity test. Paris, 1984.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline for testing of chemicals n. 222—Earthworm reproduction test. Paris, 2004.

PARK H. W.; KOH K. S., PARK S.C. Molecular weights and inhibitor sensitivities of alkaline phosphatase isoenzymes from the midgut of the earthworm, *Eisenia andrei*. Soil Biology and Biochemistry. V30, n6: 831-832, 1998.

PARK S. C.; PARK H. W.; SMITH T. J. Expression of alkaline phosphatases during embryonic development and immature stages of the earthworm, *Eisenia Andrei*. Soil Biology and Biochemistry. V28, n4-5: 579-582, 1996.

PÉREZ-LOSADA, M., EIROA, J., MATO, S., DOMÍNGUEZ, J. Phylogenetic species delimitation of the earthworms *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché, 1972 (Oligochaeta, Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA genes. Pedobiologia 49, 317–324, 2005.

PINHO G.L.L., MOURA DA ROSA, MACIEL F.E., BIANCHINI A, YUNESC J.S., L.A.O. PROENC, MONSERRAT J.M. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. Ecotoxicology and Environmental Safety 61: 353–360, 2005.

PRABHA, L M; JAYARAAJ I A; JEYARAAJ R; SRINIVASA R. Comparative studies on the digestive enzymes in the gut of earthworms, *Eudrilus eugenia* and *Eisenia foetida*. Indian Journal of Biotechnology. 6:567-569; 2007.

PRAT, P., CHARRIER, M., DELEPORTE, S., FRENOT, Y. Digestive carbohydrases in two epigenic earthworm species of the Kerguelen Islands (Subantarctic). Pedobiologia 46, 417–427, 2002.

RAO, J.V., PAVAN, Y.S., MADHAVENDRA, S.S. Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, *Eisenia foetida*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 54, 296–301.; 2003.

RAULT M, MAZZIA C, CAPOWIEZ Y. Tissue distribution and characterization of cholinesterase activity in six earthworm species. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 147:340–346; 2007.

RAVINDRAN B., DINESH S.L., KENNEDY L. J., SEKARAN G. Vermicomposting of Solid Waste Generated from Leather Industries Using Epigeic Earthworm *Eisenia foetida*. Applied Biochem Biotechnol; 151:480–488, 2008.

REINECKE, S.A., REINECKE, A.J. Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms. Ecotoxicology and environmental Safety. 66, 92–101.; 2007.

RIZWAN-UL-HAQ M., ZHENLING Z., YONGXUE S., WENGUANG X. Evaluation of glutathione s-transferase as toxicity indicator for roxarsone and arsanilic acid in *Eisenia fetida*. Journal of Applied Toxicology 32: 731–738, 2012.

RODRIGUEZ-CASTELLANOS, L.; SANCHEZ-HERNANDEZ J. C. Earthworm biomarkers of pesticide contamination: Current status and perspectives. Journal of Pesticide Science.32(4), 360–371, 2007.

SAINT-DENIS M, LABROT F, NARBONNE JF, RIBERA D. Glutathione, glutathione related enzymes and catalase activities in the earthworms *Eisenia fetida andrei*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 35, 602–614; 1998.

SCAPS P, GRELE C, DESCAMPS M. Cadmium and Lead Accumulation in the Earthworm *Eisenia fetida*(Savigny) and its Impact on Cholinesterase and Metabolic Pathway Enzyme Activity. Comparative Biochemistry and Physiology. 116C, No. 3, pp. 233–238, 1997

SCHUMANN G, BONORA R, CERIOTTI F, FÉRARD G, FERRERO CA, FRANCK PF, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Clin Chem Lab Med.40(7):718-24, 2002.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. W.; DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *The Biochemical Journal*. 360: 1 – 16, 2001.

SINGH J., KAUR A., VIG A.P., RUP, P.J. Role of *Eisenia fetida* in rapid recycling of nutrients from biosludge of beverage industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 430–435, 2010.

TIETZ NW, RINKER AD, SHAW LM. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase (orthophosphoric-monoester phosphohydrolase, alkaline optimum, EC 3.1.3.1). *J Clin Chem Clin Biochem*. 21(11):731-48, 1983.

UEDA M., ASANO T., NAKAZAWA M., MIYATAKE K., INOUE K. Purification and characterization of novel raw-starch-digesting and cold-adapted α -amylases from *Eisenia foetida*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 150: 125–130, 2008.

VALEMBOIS P, LASSÈGUES M. In vitro generation of reactive oxygen species by free coelomic cells of the annelid *Eisenia fetida andrei*: an analysis by chemiluminescence and nitro blue tetrazolium reduction. *Developmental Comparative and Immunology*. 19(3):195-204, 1995.

VARGAS M. A., GEISH M. A., MACIEL F. E., CRUZ B. P., FILGUEIRA D. M. V. B., FERREIRA G. J., NERY L. E. M., ALLODI S. Influence of the dark/light rhythm on the effects of UV radiation in the eyestalk of the crab *Neohelice granulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 151: 343–350, 2010.

VELKI M., HACKENBERGER B. K. Biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei* exposed to pirimiphos-methyl and deltamethrin using different toxicity tests. *Chemosphere* 90: 1216–1226, 2013.

WENK M. R.; FERNANDIS A. Z. *Manuals in Biomedical Research — Vol. 3 A Manual for Biochemistry Protocols*. 2007 by World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.

WHALEN J K; PARMELEE R W; SUBLER S. Quantification of nitrogen excretion rates for three lumbricid earthworms using ¹⁵N. *Biology and Fertility of Soils* 32:347–352, 2000.

WINN-DEEN ES, DAVID H, SIGLER G, CHAVEZ R. Development of a direct assay for alpha-amylase. *Clinical Chemistry*. 34(10):2005-8, 1988.

WU S, WU E, QIU L, ZHONG W, CHEN J. Effects of phenanthrene on the mortality, growth, and anti-oxidant system of earthworms (*Eisenia fetida*) under laboratory conditions. *Chemosphere*. 2011 Apr;83(4):429-34.

XUE Y, GU X, WANG X, SUN C, XU X, SUN J, ZHANG B (2009). The hydroxyl radical generation and oxidative stress for the earthworm *Eisenia fetida* exposed to tetrabromobisphenol A. *Ecotoxicology*. Aug;18(6):693-9.

YASMIN S; D'SOUZA D. Effect of Pesticides on the Reproductive Output of *Eisenia fetida*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79:529–532; 2007.

ZHANG X, LU L, SHI Y; CHEN C; YANG Z; LI Y; FENG. Antioxidant and metabolic responses induced by cadmium and pyrene in the earthworm *Eisenia fetida* in two different systems: contact and soil tests. *Chemistry and Ecology*, 25/3: 205–215, 2009.