



AGNIS CRISTIANE DE SOUZA

**PARASITICIDAS SINTÉTICO E NATURAL EM
BOVINOS: ESCARABEÍNEOS COMO
INDICADORES DE IMPACTOS AMBIENTAIS
SOBRE PASTAGENS DO CERRADO**

LAVRAS – MG

2016

AGNIS CRISTIANE DE SOUZA

**PARASITICIDAS SINTÉTICO E NATURAL EM BOVINOS:
ESCARABEÍNEOS COMO INDICADORES DE IMPACTOS
AMBIENTAIS SOBRE PASTAGENS DO CERRADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador
Dr. Julio Louzada

Coorientadora
Dra. Ronara Souza Ferreira

LAVRAS - MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Souza, Agnis Cristiane de.

Parasitocidas sintético e natural em bovinos: escarabeíneos
como indicadores de impactos ambientais sobre pastagens do
Cerrado / Agnis Cristiane de Souza. – Lavras : UFLA, 2016.
66 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador(a): Julio N. C. Louzada.

Bibliografia.

1. Medicamentos veterinários. 2. Nim. 3. Ivermectina. 4. Rola-
bostas. 5. Avaliação ambiental. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

AGNIS CRISTIANE DE SOUZA

**PARASITICIDAS SINTÉTICO E NATURAL EM BOVINOS:
ESCARABEÍNEOS COMO INDICADORES DE IMPACTOS
AMBIENTAIS SOBRE PASTAGENS DO CERRADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2016.

Dra. Vanesca Korasaki

UEMG

Dra. Amanda Fialho

UFLA

Orientador

Dr. Julio Louzada

Coorientadora

Dra. Ronara Souza Ferreira

LAVRAS - MG

2016

COMPUTADORES FAZEM ARTE
ARTISTAS FAZEM DINHEIRO.
COMPUTADORES FAZEM ARTE
ARTISTAS FAZEM DINHEIRO.
COMPUTADORES AVANÇAM
ARTISTAS PEGAM CARONA.
CIENTISTAS CRIAM ROBÔS
ARTISTAS LEVAM A FAMA.

O HUMANO COLETIVO SENTE A NECESSIDADE DE
LUTAR!

CHICO SCIENCE E NAÇÃO ZUMBI

*A todos os **rola-bostas** que morreram para que esse trabalho fosse realizado.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos amores da minha vida Mamadi (Jeane Padilha) e Gabi (Ana Gabriela Lobo) que são as pessoas mais chatas e lindas maravilhosas ao mesmo tempo, sem as quais nada teria sentido nessa vida. Que fazem o tempo ser diferente quando estamos perto e longe, quando perto por mais de uma semana queremos ficar longe, mas quando estamos longe ficamos sempre querendo estar perto, um lindo paradigma.

A Rosa mais linda, Clarissa que faz meus dias mais felizes e cheios de aventura desde que a universidade nos juntou. Ao meu querido amigo Betinho que foi o maior incentivador para eu entrar no mestrado e me acompanhou em todos os momentos sempre com um sorriso animador. Ao Juliano que realmente faz a diferença no mundo e não podia ser diferente na nossa amizade, um exemplo de people. Ao Marquinho que me ensinou muito sobre viver as experiências e sempre buscar adquirir cultura. Somos os 5 elementos do sítio FORÇA VERDE, além é claro da Maia e Terra, que tornaram o último semestre do mestrado sensacional. A cada pedaço do sítio, especialmente a grama ao redor da casa, que por mais que eu cortasse com esmero, 2 semanas depois, lá estava ela enorme novamente. A vida no sítio trouxe a realidade de que tudo muda e é preciso viver o presente e sempre fazer algo, mesmo que depois volte (aparentemente) tudo para o mesmo lugar.

Aos meus queridxs e amadxs Chefes: Julio Louzada e Ronara S. Ferreira. Sem vocês nada disso seria possível! Meu sincero muito obrigada! Por aguentar as minhas fritações e mais ainda fritar comigo na busca por um mundo melhor, em que você pode sim fazer diferente e muda-lo hoje.

A turma de mestrado que fizeram os dias de aula mais interessantes cada um a sua maneira e fizemos o rock mais legal que a Entomologia já viu. Ao pessoal do Laboratório de Ecologia e Conservação de Invertebrados

que desde 2013 me ensinaram muito sobre ciência e como ela fica muito melhor ligada a fortes amizades deixando tudo super! Não posso deixar de mencionar o André, que me indicou para a vaga de pesquisadora, além de Vanesca e Ronara que fizeram minha entrevista e foram tão receptivas comigo me proporcionando os lindos anos da minha vida em Lavras. Aos meus queridos amigos de todos os dias Chain, Ernesto e Guilherme os mais lindos do universo que sempre me deram o apoio e carinho.

As amiguinhas da vida toda: Larissa, Lariane e Maria que são parte dessa conquista, porque tudo é como tem que ser, porque se não fosse não seria! Depois de quatro anos daqueles tempos maravilhosos na faculdade, foram nossas conversas sobre o futuro que me direcionaram para trabalhar com entomologia.

A todxs da ENEBio que despertou em mim com muito amor e amizade o sentido de lutar pelo coletivo, em especial ao meu querido amigo Frê, por sempre ficar um pouco mais para mais um café e partilhar comigo as lindas noites de filme e fry chicken. Nesse mesmo contexto também agradeço ao pessoal da APG chapa Construção, por me proporcionar ir além dos estudos durante o mestrado e lutar por melhores condições para a universidade e a todxs xs pós-graduandxs.

A todo mundo que me ajudou nos experimentos de campo, laboratório e outras etapas MUITO OBRIGADA!. A Dona Fátima, Seu Chiquinho e todos da família, pelo suporte não só em disponibilizar as vacas com diferentes tratamentos que deu um trabalhão, mas por partilharem comigo a amizade, além daqueles almoços e cafezinhos que faziam total diferença depois de um dia cansativo de trabalho. Em especial aos queridos amigos Lipe e a Luiza que estiveram comigo no campo e a Drienen que me ajudou a montar o experimento do lab.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade de realização do mestrado. A todas(os) (as)os professoras(es) da Entomologia, Ecologia e Engenharia Florestal, que foram sempre tão receptivos nas conversas e me ajudaram a ampliar minha visão sobre ciência.

Nesse mundo capitalista em que é preciso ter grana para que seja realizada qualquer coisa, agradeço ao CNPq pela bolsa de estudos oferecida durante a realização do mestrado. Com toda certeza permitiu que eu tivesse tranquilidade e não ficar me preocupando com os próximos 30 dias, o que me fez aprender muito e desenvolver esse estudo.

RESUMO

Com a maior população comercial bovina do mundo, o Brasil abriga mais gado do que pessoas no seu território. O Cerrado brasileiro é responsável por 34% do total da produção de carne bovina, manejadas em pastagens nativas e exóticas. O uso indiscriminado de parasiticidas ou como são comumente conhecidos, os medicamentos veterinários, para o combate de pragas que afetam o gado, têm tornado comum a presença de resíduos desses produtos na carne e no leite. A preocupação mundial com a segurança alimentar do consumidor, além dos riscos ambientais provocados pelos medicamentos veterinários, aumentou a procura por alternativas eficientes e com menor impacto. Nesta dissertação eu tive como objetivo realizar uma avaliação ambiental, utilizando rola-bostas como bioindicadores, dos parasiticidas Nim e Ivermectina em pastagens introduzidas e naturais do Cerrado. No primeiro capítulo nós realizamos testes com chance de escolha, utilizando fezes bovinas contendo resíduos de Nim, Ivermectina e sem resíduo, em oito pastagens nativas e oito introduzidas do Cerrado. Nós avaliamos as consequências dos resíduos dos medicamentos veterinários nas fezes bovinas sobre as funções ecológicas de enterrio de fezes e bioturbação do solo, além de atributos da comunidade (riqueza, abundância, biomassa e composição) dos rola-bostas. Os escarabeíneos realizam maior taxa de funções ecológicas em fezes com resíduos dos medicamentos veterinários natural e sintético comparados as fezes livre de resíduos. Além disso, os atributos da comunidade (riqueza, abundância, biomassa e composição) de rola-bosta capturados nas fezes com resíduos, são diferentes entre pastagens naturais e introduzidas. Concluimos que para acessar os riscos dos medicamentos veterinários na fauna não alvo, é preciso considerar como fator sinérgico o tipo de pastagem onde o gado é manejado. No segundo capítulo nós realizamos um teste sem chance de escolha em laboratório utilizando *Dichotomius nesus* Oliver, 1798 uma espécie de rola-bosta amplamente encontrada nas pastagens brasileiras. Nós avaliamos as consequências dos resíduos dos medicamentos veterinários (Nim e Ivermectina) sobre as funções ecológicas realizadas pela espécie. Adicionalmente, nós realizamos a extração de gordura dos indivíduos, para avaliar o status do rola-bosta adulto exposto a diferentes tipos de resíduos. *D. nesus* não altera o comportamento na presença de Nim e Ivermectina comparado com controle, porém os indivíduos que ficaram expostos a Ivermectina tiveram 5% mais gordura acumulada. Nossos resultados apontam a necessidade de múltiplos testes (i.e ecologia, comportamento e fisiologia) para acessar os riscos dos resíduos de medicamentos veterinários sobre a fauna não alvo. Eu concluo que para avaliação em campo dos riscos dos resíduos dos medicamentos veterinários sobre os rola-bostas, o tipo de pastagem deve ser considerado como fator sinérgico. Ademais, o Nim pode ser considerado uma

alternativa com menor impacto aos rola-bostas quando comparado com a Ivermectina, visto que não alterou a quantidade de gordura em *D. nesus*. Além disso, as fezes com resíduo de Nim tiveram maior taxa de funções ecológicas realizadas pela comunidade de rola-bosta em pastagens naturais e introduzidas, o que representa uma vantagem ao produtor.

Palavras-chave: Medicamentos veterinários, Nim, Ivermectina, Rola-bostas, Avaliação ambiental.

ABSTRACT

With the largest commercial cattle population in the world, Brazilian territory harbors more cattle than humans. The Cerrado (Brazilian Savannah) is responsible for 34% of total beef production, which is managed in native and exotic pasture. Such a big cattle population has been a scenario for indiscriminate use of synthetic parasiticides, commonly known as veterinary pharmaceutical, to control pests in cattle, resulting in great incidence of residues in meat and milk. The importance of food security and environmental risks associated to veterinary pharmaceutical residues has increased the demand for low-impact alternatives of food production. Here, I assessed, using dung beetles as an indicator group, the environmental risks associated to use of two veterinary pharmaceutical (Neem plant and Ivermectin) in native and introduced pastures in the Cerrado. In the first chapter we performed free choice tests with dung contaminated with Neem, Ivermectin residues and free residues, in eight introduced and eight native pastures. We evaluated the consequences of veterinary pharmaceutical over ecological functions of burial dung and soil bioturbation, and community attributes (richness, abundance, biomass and composition) of dung beetles. Both pasture system and veterinary pharmaceutical type affected all aspects of dung beetles community. The dung beetles performed more ecological functions in dung contaminated with Neem and Ivermectin, than in free residues dung. In addition, the community attributes (richness, abundance, biomass and composition) of dung beetles captured in dung with Neem and Ivermectin is distinct between native and introduced pastures. Our findings highlight that veterinary pharmaceutical and pastures systems must to be considered as synergic factors for assess the risks of use veterinary pharmaceutical in non-target fauna. In the second chapter, we performed a non-choice laboratory test using *Dichotomius nisus* Oliver, 1798 a dung beetle species widely found in Brazilian pastures. We evaluated the effects of veterinary pharmaceutical residues (Neem and Ivermectin) on the ecological functions performed by dung beetles. Additionally, we performed extraction of the dung beetles fat amount in order to evaluate the physiological status of adult dung beetles exposed to the different types of residues. *D. nisus* do not alter their behaviour in the presence of Ivermectin and Neem residues when compared with control, but the individuals exposed to Ivermectin have 5% more fat. Our findings stresses the need for multiple tests (i.e. ecology, behaviour and physiology) to assess the risks of veterinary pharmaceuticals in non-target fauna. I conclude that the assessment of environmental risks of the veterinary pharmaceutical to dung beetles must include pasture system as a synergic factor. In addition, Neem can be considered less-impactant than Ivermectin, since does not alter the fat amount in *D. nisus*. Also, dung with Neem residues has more

ecological functions performed by dung beetles than dung with Ivermectin, which can be beneficial to cattle producers.

Keywords: Veterinary pharmaceutical, Neem, Ivermectin, Dung beetles, Environmental assessment.

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	14
1.1 JÁ COMEU CARNE HOJE? STATUS E PERSPECTIVAS NO MAIOR PRODUTOR DE CARNE DO MUNDO.....	14
2. OBJETIVOS	18
3. REFERENCIAL TEÓRICO	19
Controle de Pragas no Gado.....	19
Lactonas Macro-cíclicas - Ivermectina	20
<i>Azadirachta indica</i> - Nim.....	21
Os Besouros Rola-Bosta	23
4. REFERÊNCIAS.....	24
5. CAPÍTULO 1:.....	27
Synergetic effects of veterinary pharmaceuticals use and pasture conversion on dung beetle community.....	27
ABSTRACT	28
Introduction.....	29
Methods	30
<i>Study site</i>	30
<i>Dung collection</i>	31
<i>Ecological functions test</i>	31
<i>Statistical analyses</i>	32
Results.....	33
<i>Dung attractiveness and biodiversity</i>	33
<i>Ecological functions</i>	34

<i>Species composition</i>	35
Discussion.....	36
Acknowledgements.....	38
References.....	38
6. CAPÍTULO 2.....	50
The influence of veterinary pharmaceutical residues on dung beetle behaviour and physiology: does Neem trigger the same response as Ivermectin?.....	50
Abstract.....	51
Introduction.....	52
Methods	53
Dung beetles collection.....	53
Dung collection.....	54
Experimental design.....	54
Beetles' Fat extraction	55
Statistical analyses	55
Results.....	56
Ecological functions.....	56
Fat body proportion.....	56
Discussion.....	56
Conclusion	58
Acknowledgements.....	58
References.....	59
7. CONCLUSÕES GERAIS	64
8. REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 JÁ COMEU CARNE HOJE? STATUS E PERSPECTIVAS NO MAIOR PRODUTOR DE CARNE DO MUNDO

A alimentação é a condição *Sine qua non* para a sobrevivência humana. A preocupação com a produção de alimentos sempre foi uma questão que perpassou as civilizações, principalmente com o crescimento populacional a partir da Revolução Industrial no século XVIII. Porém, há cerca de 70 anos atrás, a produção mundial de comida começou a ser extremamente modificada com a Revolução Verde, levando para a agropecuária um grande incremento tecnológico, modificando a estrutura do manejo rural. Itens como máquinas, produtos químicos sintéticos, sementes e animais melhorados, passaram a fazer parte do pacote tecnológico utilizado na produção de comida (ANDRADES e GANIMI, 2007).

O Brasil tem um papel fundamental na produção da carne, principalmente bovina, consumida por vários países no mundo. De cada três quilos de carne comercializados no mundo, um quilo provém do Brasil, sendo o maior exportador de carne bovina do mundo desde 2008 e com perspectivas de aumento nas exportações para os próximos anos. (MAPA, 2016). O alto impacto na alimentação da população mundial provoca uma forte pressão quanto à qualidade da carne produzida no Brasil. A preocupação mundial com a segurança alimentar e os impactos ambientais causados pelo manejo bovino, tornou crescente a criação de programas para avaliação da quantidade de resíduos dos parasiticidas, ou medicamentos veterinários, encontrados na carne e no leite comercializados.

Dentre os medicamentos veterinários utilizados para o controle de pragas em rebanhos, a Ivermectina é mundialmente utilizada por sua ação rápida e eficiente no controle de nematoides e artrópodes. A Ivermectina atua também

no controle de larvas de moscas hematófagas que se desenvolvem nas fezes, onde 90% do composto químico ativo são excretados sem alteração nas fezes bovinas (CAMPBELL, 1985). Contudo, os casos de resistência de pragas ao medicamento, devido ao uso além do recomendado e os resíduos de Ivermectina encontrados na carne e no leite pelo desrespeito ao período de carência (FEIJÓ et al., 2013), tem aumentado a procura por alternativas eficientes e com menor impacto.

O uso abusivo da Ivermectina já causou várias perdas econômicas ao Brasil. Em 2010 houve um corte durante sete meses na exportação de carne bovina para os Estados Unidos e em 2014 a empresa JBS foi obrigada a realizar um recall de mais de 100 toneladas de carne processada que foi exportada para os Estados Unidos pelo mesmo motivo (Portal DBO, 2014). Como uma medida de controle o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento emitiu uma Instrução Normativa (nº 13 de 29 de maio de 2014) proibindo a fabricação, manipulação, fracionamento, comercialização importação e uso da Ivermectina acima de 3% (MAPA, 2013).

Atualmente são regulados 6573 produtos de uso veterinário no Brasil (MAPA, 2014). Contudo, os parasiticidas, ou como são usualmente denominados medicamentos veterinários, não são encaixados no rótulo de “agrotóxicos” e algumas substâncias proibidas na agricultura são ainda regularizadas para o uso em animais. No Brasil os agrotóxicos utilizados na agricultura são regulados de acordo com a lei nº 7.802 de 1989, e são inspecionados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento; Ministério do Meio Ambiente e o Ministério da Saúde, assim são testados além da sua eficiência agronômica, seus efeitos à saúde humana e ao meio ambiente. Atualmente os medicamentos veterinários são regulados apenas pelo MAPA (SILVA et al., 2012).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento como medida de segurança alimentar devido à pressão mundial para o controle de resíduos de medicamentos veterinários, criou o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC) e o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet). Os programas objetivam testar amostras aleatórias de carne e leite quanto à quantidade de resíduos e assim inspecionar a qualidade da carne e leite, proporcionando maior segurança aos consumidores.

Além do uso de medicamentos veterinários, dentro do manejo bovino moderno são adotadas técnicas de conversão das pastagens naturais com alta biodiversidade em plantas, em monocultivos de gramíneas exóticas. A substituição das pastagens vem se intensificando no Brasil desde década de 90 (Figura 1). O Brasil tem políticas públicas de incentivo aos produtores para a conversão das pastagens nativas para exóticas, sobre o argumento que as gramíneas exóticas como a *Braquiária* (= *Urochloa*), apresentam maior biomassa, alto poder de dispersão e possibilitam o aumento na densidade de gado por hectare. Além disso, existem incentivos para utilização de fertilizantes para mitigar a falta de fertilidade do solo para a conversão das pastagens nativas em exóticas.

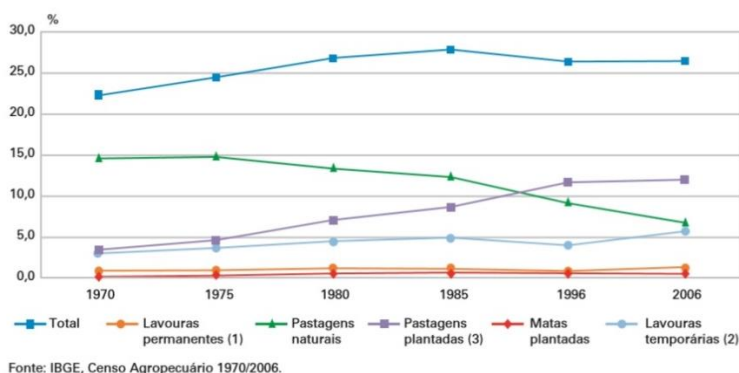


Figura 1: Proporção das Terras em uso agrossilvipastoril dos estabelecimentos agropecuários no total da área territorial, por tipo de utilização de terras no

Brasil – 1970/2006. Disponível em: Indicadores de Desenvolvimento Sustentável – Brasil 2015.

Nesse contexto, o Cerrado brasileiro tem importante papel na produção bovina, é responsável por 34% do total da produção brasileira e tem sido ampliado o processo de industrialização da produção de alimentos desde a década de 70 com a criação do POLOCENTRO (Programa de Desenvolvimento dos Cerrados) e também do PRODECER (Programa Nipo- Brasileiro de Desenvolvimento Agrícola da Região dos Cerrados). O Cerrado possui um mosaico de micropaisagens incluindo pastagens nativas como o campo limpo, campo sujo e campo rupestre, com alta biodiversidade assegurada pela frequência das queimadas, diferenças de solo e profundidade do lençol freático. Porém a simplificação desses ambientes com a conversão para monocultivos de gramíneas exóticas pode levar a destruição dos processos que asseguram a biodiversidade encontrada (BERSUSAN, 2008). A perda da biodiversidade esta diretamente relacionada com o risco da segurança alimentar do país, visto que empobrece a base genética gerando populações mais suscetíveis a alterações do ambiente.

Na busca por segurança alimentar, os medicamentos veterinários naturais voltaram ao *hall* de alternativas com a mesma eficiência agrônômica e com menor impacto negativo sobre a saúde humana e ao meio ambiente. Nesse sentido as sementes da árvore de Nim (*Azadirachta indica*) têm sido amplamente recomendadas pelo seu alto potencial inseticida. A molécula responsável pela ação contra artrópodes é a azadiractina (LUNTZ e NISBET, 2000).

Com registros da sua eficiência no controle de pragas que afetam o gado (BROGLIO-MICHELETTi et al., 2010; LIPINSKI et al., 2011), o Nim tem sido cotado como uma alternativa para o uso da Ivermectina. De fácil extração, o Nim pode ser considerado uma alternativa barata e segura aos produtores, que

podem ter a planta na sua propriedade e utilizá-la sem riscos à saúde. Contudo não existe uma avaliação ambiental dos efeitos do Nim atestando sua segurança quanto à fauna não-alvo.

Para que possamos avançar nas técnicas utilizadas no manejo bovino é necessário aliar conhecimentos agrônômicos com ecológicos, proporcionando a continuidade dos processos ecológicos nas pastagens e assim, maior qualidade em todos os aspectos da cadeia produtiva de carne.

OBJETIVOS

A presente dissertação compreende uma compilação dos estudos realizados durante meu mestrado em Entomologia e tem como objetivo geral a avaliação ambiental, utilizando besouros rola-bostas como bioindicadores, dos medicamentos veterinários Nim e Ivermectina manejados em bovinos tanto em pastagens introduzidas/plantadas como naturais do Cerrado.

Seguem-se dois capítulos, o primeiro “Synergetic effects of veterinary pharmaceuticals use and pasture conversion on dung beetle community”, objetiva através de experimentos com chance de escolha em campo, em pastagens nativas e introduzidas do Cerrado, avaliar quais as consequências dos resíduos dos medicamentos veterinários Nim e de Ivermectina, presentes nas fezes bovinas, nos padrões da comunidade de besouros rola-bostas (riqueza, abundância, biomassa e composição), e também nas funções ecológicas de enterrio de fezes e revolvimento de solo executadas por esses insetos. Este trabalho está de acordo com as normas da revista Plos One. O segundo capítulo “The influence of veterinary pharmaceutical residues on dung beetle behaviour and physiology: Does Neem trigger the same responses as Ivermectin?” objetiva em laboratório utilizando teste sem chance de escolha, avaliar quais os efeitos dos resíduos de Nim e Ivermectina sobre as funções ecológicas de enterrio de fezes e revolvimento de solo realizadas pela espécie de besouro rola-bosta

Dichotomius nesus. Além disso, realizamos a extração de gordura dos besouros rola-bostas expostos aos diferentes tratamentos (Nim, Ivermectina e controle), como um proxy da condição fisiológica dos besouros. Este capítulo está de acordo com as normas da revista *Insect Conservation and Diversity*.

REFERENCIAL TEÓRICO

Controle de Pragas no Gado

Com o maior rebanho comercial de bovinos do mundo distribuídos por todo o território brasileiro, concentrados principalmente nos Estados do Mato Grosso e Minas Gerais, o Brasil ocupa também um lugar de destaque no consumo de parasiticidas para o controle de pragas que afetam o gado. Os fatores históricos explicam esse tipo de manejo, que teve início nas décadas de 1960 e 70 com a introdução do pacote tecnológico para a produção bovina nas políticas públicas brasileiras. O pacote contou com a introdução da mecanização da produção, sementes melhoradas para a produção de pastagens e uso de insumos químicos, como fertilizantes e agrotóxicos. A universidade teve papel importante para a implantação do pacote tecnológico no Brasil, formando pesquisadores hegemonicamente influenciados por esse modelo de ensino. Este panorama foi apoiado pelo governo, principalmente com atos como a criação da Embrapa, da Embrater, do Programa Nacional de Defensíveis Agrícolas e concessão de parte do crédito rural para consumo de agrotóxicos. Além disso, fatores ambientais brasileiros, como a alta temperatura e umidade propiciam a alta densidade populacional das pragas. Os artrópodes, como os carrapatos e as moscas hematófagas, são pragas importantes pois afetam os rebanhos diretamente causando perdas econômicas aos produtores. Além disso, algumas pragas são vetores de doenças, como por exemplo a tristeza parasitária, uma doença causada por protozoários no sangue do gado e são transmitidas por moscas (NETO e TOLEDO-PINTO, 2007; FRAGA et. al., 2007). O controle

dos pragas é usualmente realizado com produtos químicos sintéticos, principalmente os parasiticidas sistêmicos, aqueles que são transportados pela corrente sanguínea do animal, atingindo todas as partes do corpo. O desrespeito dos períodos de carência dos produtos, o uso além do recomendado aliado à falta de políticas públicas efetivas para a conscientização dos produtores sobre os riscos ambientais e de saúde pública, aumentam os níveis de resíduos dos medicamentos veterinários encontrados na carne e leite, além de favorecerem o aparecimento de resistência em populações de pragas (FRAGA et al., 2003; NETO e TOLEDO-PINTO, 2007).

Por outro lado o debate sobre a segurança alimentar demonstrando a necessidade da população humana em consumir alimentos de qualidade, a busca por métodos alternativos de controle de pragas tem aumentado consideravelmente. Dentre as alternativas propostas podemos citar o manejo integrado de pragas (MIP), homeopatia e uso de bioinseticidas, como bons exemplos de formas alternativas de controle de pragas (CATTO e BIANCHIN, 2007). Apesar de amplas alternativas ao uso dos medicamentos veterinários sintéticos, as técnicas alternativas não tem sido adotadas em políticas públicas de larga escala, o que dificulta na disseminação dessas práticas.

Lactonas Macroclílicas - Ivermectina

O grupo químico das lactonas macroclílicas é composto pelas avermectinas e milbemicinas. Estas consistem em uma série de derivados de lactonas macroclílicas, que são produtos da fermentação dos actinomicetos *Streptomyces avermitilis* (avermectina) e *Streptomyces cyanogriseus* (milbemicinas). Estas espécies de bactérias gram-positivas possuem a sequência genômica conhecida (MOURA et al., 2006;). As avermectinas e milbecinas atuam na junção neuro-muscular dos insetos, sendo agonistas do neurotransmissor GABA, ou seja, se ligam nos receptores desses

neurotransmissores. Ao se ligarem a esses receptores abrem os canais de cloro presentes nas membranas dos neurônios, levando ao bloqueio na transmissão de estímulos (CAMPBELL, 1989). As avermectinas incluem abamectina, doramectina, eprimectina e ivermectina e são ativas contra uma ampla variedade de nematódeos e artrópodes. A moxidectina é uma milbemicina e tem espectro de atividade semelhante (LUMARET e ERROUSSI, 2002).

A Ivermectina foi a primeira avermectina introduzida no mercado em 1981. Este parasiticida teve aceitação no mundo todo por seu alto potencial de controle de pragas (CAMPBELL, 1989). A Ivermectina tem sido usada como antiparasita em bovinos, ovelhas, cavalos e outros animais domésticos e até mesmo em terapias com seres humanos contra uma ampla gama de parasitas. Este parasiticida é absorvido sistemicamente após administração oral, subcutânea ou dérmica, mas é absorvido em maior grau, e tem meia vida mais prolongada, quando administrado por via subcutânea ou dérmica (LUMARET e ERROUSSI 2002, CAMPBELL 1989). Porém o uso indiscriminado desse inseticida aumentou os problemas com resistência de insetos, ressurgência e erupção de pragas.

***Azadirachta indica* - Nim**

Azadirachta indica A. Juss (sin. *Antelaea azadirachta*, *Melia azadirachta*) comumente conhecida como Nim, tem origem no sul e sudeste da Ásia. Pertence à família Meliaceae, assim como o mogno, suas árvores podem atingir 20 metros de altura. Todas as partes da planta contêm substâncias ativas com potencial inseticida, porém as sementes possuem maiores concentrações de azadiractina, que possui alta toxicidade a insetos e apresenta potencial anti-alimentar. Uma árvore chega a produzir cerca de dois quilos de semente por ano. Sua vantagem como inseticida é a fácil extração, podendo ser realizada com

água ou solventes orgânicos (MOSSINI e KEMMELMEIER, 2005; CHAGAS e VIEIRA, 2007, LUNTZ e NISBET, 2000).

No mundo está ocorrendo uma demanda crescente por alimentos de origem orgânica, gerando assim uma pressão nos produtores para buscar alternativas de controle que não alterem a qualidade da carne e do meio ambiente. O Nim não apresenta registro de toxicidade aos humanos visto que os moradores da África e do Caribe se alimentam dos frutos maduros (SCHMUTTER, 1990).

O conhecimento das propriedades desta planta é usado por séculos no Oriente como planta medicinal, planta sombreadora, repelente, material para construção, combustível, produção de lenha, lubrificante, adubo e mais recentemente como pesticida (MOSSINI e KEMMELMEIER, 2005). No meio científico as propriedades do Nim vem sendo amplamente confirmadas, sendo que já foram realizadas mais de seis conferencias internacionais sobre o potencial da planta. Os principais componentes químicos encontrados nesta planta são uma mistura de 3 ou 4 compostos terpenóides correlatos, que podem ser modificados em mais de 20 outros menores, mas menos ativos. Geralmente os compostos pertencem ao grupo dos triterpenos, mais especificamente limonóides. O principio ativo do Nim com maior potencial inseticida é a azaradictina. A estrutura da azaradictina tem sido estudada por décadas por sua complexidade e foi isolada da semente pela primeira vez em 1968 por David Morgan, mas levou mais de 18 anos para que sua complexa molécula fosse inteiramente descrita (LUNTZ e NISBET, 2000). É uma substância muito sensível aos raios ultravioletas e aos meios ácidos ou básicos, apresentando uma rápida degradação na presença destes (CHAGAS e VIEIRA, 2007). A azadiractina atua em modo dose-dependente. Esta substância torna o alimento impalatável aos insetos, prejudicando a qualidade dos alimentos ingeridos, e também reduzindo a eficiência das atividades enzimáticas dos insetos. Além

disso, a azadiractina interfere no sistema neuroendócrino do inseto, atuando sobre os hormônios reguladores de crescimento, a ecdisona e o hormônio juvenil, causando danos negativos durante a metamorfose e outras fases do desenvolvimento do inseto (CHAGAS e VIEIRA, 2007).

Contudo, o Nim por apresentar propriedades ativas contra pragas, é preciso levar em conta que mesmo sendo um produto natural, se manejado incorretamente pode ter aspectos negativos, como por exemplo seu efeito abortivo, podendo levar até mesmo a esterilidade do animal (MORAVATI et al., 2008).

Os Besouros Rola-Bosta

Rola-bosta é o nome popular dado aos besouros coprófagos, pertencentes à família Scarabaeidae, subfamília Scarabaeinae. Esta denominação atribuída a estes insetos é devido ao fato de se alimentarem de massas fecais de animais de médio e grande porte. Com base nos hábitos de nidificação, os besouros coprófagos podem ser agrupados em endocoprídeos, paracoprídeos e telecoprídeos. Besouros paracoprídeos constroem galerias embaixo ou ao redor da massa fecal, onde enterram porções de fezes, formando assim seus ninhos. Já os telecoprídeos, separam uma porção da massa fecal, a moldam em formato de uma esfera, e a rolam a uma determinada distância, onde a enterram. Nos besouros endocoprídeos, se alimentam e constroem o ninho no interior da massa fecal (DOUBE, 1990).

As funções ecológicas realizadas pelos besouros rola-bosta influenciam na manutenção dos ecossistemas, como por exemplo, promovem a ciclagem de nutrientes. Além disso, os besouros escarabeíneos atuam como competidores de nematoides gastrointestinais e moscas de importâncias veterinária que se desenvolvem nas fezes, controlando estas populações. Ao enterrarem as fezes

promovem a bioturbação o que aumenta a aeração do solo e auxilia na permeabilidade de água no solo (NICHOLS et al., 2009).

Os rola-bostas tem sido amplamente utilizados como indicadores ambientais para avaliação dos riscos do uso de medicamentos veterinários (SCHOLTZ e JACOBS, 2015). O declínio de populações de rola-bostas devido ao uso dos medicamentos veterinários (Ivermectina), tem chamado atenção mundial (VERDU et al., 2015). A busca por métodos de controle de pragas que sejam seletivos, não afetando os rola-bostas é de extrema importância para a manutenção dos agroecossistemas.

REFERÊNCIAS

- Andrades, T. O. e Ganimi, R. N. Revolução Verde e a Apropriação Capitalista. **CES Revista**, 21, p. 43-56, 2007.
- Bensusan, N. [Organização]. Seria melhor mandar ladrilhar? Biodiversidade – como, para que e por quê. São Paulo: Peirópolis; Brasília, DF: Editora Universidade de Brasília, 428 pp, 2008.
- Braga, R.F. Efeitos da alteração de uso do solo na Amazônia brasileira sobre serviços ecológicos proporcionados pelos Scarabaeinae (Coleoptera: Scarabaeidae). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras. 61pp, 2009.
- Broglio-Micheletti, S. M. F.; Dias, N. S.; Valente, E. C. N.; Souza, L. A.; Lopes, D. O. P.; Santos, J. M. Ação de extrato e óleo de nim no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 19 (1), p. 44-48, 2009.
- Catto, J. B.; Bianchin, I. Efeito de sistema de pastejo e de espécies forrageiras na contaminação da pastagem e no parasitismo por nematoides gastrintestinais em bovinos de corte. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**, 8(4), p. 343-353, 2007.
- Campbell, WC. Ivermectin: an update. **Parasitology Today**, 1:10-16, 1985.
- Campbell, W. C. Ivermectin and abamectin. **Springer Science & Business Media**, 1989.
- Chagas, A.C.S; Vieira, L. S. Ação de *Azadirachta indica* (Neem) em nematódeos gastrintestinais de caprinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 44(1), p. 49-55, 2007.
- Doube, B. M. A functional classification for analysis of the structure of dug beetle assemblages. **Ecological Entomology**, 15(4), p. 371-383, 1990.
- Fraga, A. B. G.; Alencar, M. M.; Figueiredo, L. A.; Razook, A. G.; Cyrillo, J. N. S. G. Análises de Fatores Genéticos e Ambientais que Afetam a Infestação de Fêmeas Bovinas da Raça Caracu por Carrapatos (*Boophilus microplus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, 32(6), p. 1578-1586, 2003.

- Feijó, L.D.; Fleury, A. J. Portz, R. L.; Castelo Branco, R. S.; Silva, M. S. Identification and assesment of emerging issues associated with chemical contaminants in dairy products. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>. Acesso em: 02 jan. 2016.
- Lipinski, L. C.; Martinez, J. L.; Santos, M. V. R., Ferreira, J. N.; Pfau, D. R. Avaliação do efeito anti-helmíntico e das alterações metabólicas em búfalos (*Budalus bubalis*) com administração da torta de neem e do alho desidratado no Sul do Paraná. **Revista Brasileira de Agroecologia**, 6(3), p. 168-175, 2011.
- Lumaret, J. P.; Errouissi, F. Use of anthelmintics in herbivores and evaluation of risks for the non target fauna of pastures. **Veterinary Research**, 33, p. 547-562, 2002.
- Luntz, A.J.M.; Nisbet, A.J. Azadirachtin from the Neem Tree *Azadirachta indica*: its Action Against Insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 29(4) p. 615-632, 2000.
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2016. Exportação de carne bovina brasileira. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal>. Acesso em: 02 jan. 2016.
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2014. Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários – Relatório de Produtos com Licença Vigente. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 02 jan. 2016.
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2013. Instrução Normativa nº 13 de 29 de maio de 2014. Disponível em: <http://www.jusbrasil.com.br/diarios/71104032/dou-secao-1-30-05-2014-pg-55>. Acesso em: 02 jan. 2016.
- Matos, P.F.; Pessôa, V.L.S. A apropriação do cerrado pelo agronegócio e os novos usos do território. **Campo-Território: revista de geografia agrária**. 9(17), 2014.
- Martha Junior, G. B.; Vilela, L. Documento 50- Pastagens no Cerrado: baixa produtividade pelo uso limitado de fertilizantes. In **Embrapa Cerrados** (Ed.). Planaltina, DF, Brasil. 32pp, 2002.
- Morovati, M., Mahmoudi, M., Ghazi-Khansari, M., khalilaria, A., Jabbari, L. Sterility and Abortive Effects of the Commercial Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) Extract NeemAzal-T/S[®] on Female Rat (*Rattus norvegicus*). **Turkish Journal of Zoology**, 32(2), 155-162, 2008.
- Moura, C. S.; Guerra, M. M. P.; Silva-Junior, V. A.; Silva, C. G. C, Caju, F. M.; Alves, L. C. Avaliação histomorfométrica do parênquima testicular de ratos adultos tratados com diferentes doses de ivermectina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 58(5), p. 799-808, 2006.
- Mordue (Luntz) A. J.; Blackwell, A. Azadirachtin: an Update. **Journal of Insect Physiologic**, 30(11), p. 903-924, 1993.
- Mossini, S. A. G.; Kemmelmeier, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos usos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, 24(1), p. 139-148, 2005.
- Nelder, J.A.; Wedderburn, R. W. M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society**. 135: 370-384, 1972.
- Neto, S. F. P.; Toledo-Pinto, E. A. Análise da eficiência de carrapaticidas contra *Boophilus microplus* em gado leiteiro. **Revista Científica Eletrônica de**

- Medicina Veterinária.** 5(9), p. 1-7, 2007.
- Nichols, E.; Spector, S.; Louzada, J.; Larsen, T.; Amezcuitad, S.; Favila, M. E. The Scarabaeinae Research Network. Ecological functions and ecosystem services provided by Scarabaeinae dung beetles. **Biological Conservation**, 141, p. 1461–1474, 2008.
- Portal DBO. EUA detecta resíduo de antiparasitário. <http://www.portaldbo.com.br/Portal/Noticias/EUA-detecta-residuo-de-antiparasitario/9213>. Acessado em: 15 jun. 2014.
- Schmutterer, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, 35, p. 271-97, 1990.
- Silva, T. P. P.; Moreira, J. C.; Peres, F. Serão os carrapaticidas agrotóxicos? Implicações de riscos de trabalhadores da pecuária leiteira. **Ciência & Saúde Coletiva**, 17(2), p. 311-325, 2012.
- Scholtz, C.H. & Jacobs, C.A review on the effect of macrocyclic lactones on dung-dwelling insects : Toxicity of macrocyclic lactones to dung beetles. **Journal of Veterinary Research**, 82(1), p. 01-08, 2010.
- Verdú, J.R. Cortez, V.; Ortiz, A.J.; González-Rodríguez, E.; Martínez- Pinna, J.; Lumaret, J.P.; Lobo, J.M.; Numa, C.; Sánchez- Piñero, F. Low doses of ivermectin cause sensory and locomotor disorders in dung beetles. **Scientific reports**, 5, p.13912, 2015.

CAPÍTULO 1:

Synergetic effects of veterinary pharmaceuticals use and pasture conversion on dung beetle community

Authors: Agnis Cristiane de Souza¹, Ronara Souza Ferreira² e Julio Louzada^{1,3}

Author affiliations:

¹ Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

² Departamento de Biologia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brazil.

³ Departamento de Biologia, Setor de Ecologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Correspondence: Agnis Cristiane de Souza, Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG 37200-000, Brazil. Telefone:+55 35 99106 1911. E-mail: souzabio.agnis@gmail.com

ABSTRACT

Here we used field experiments, both in native and in introduced pastures to investigate the consequences of a natural (Neem plant extracted) and a synthetic (Ivermectin) veterinary pharmaceutical in community attributes (richness, abundance, composition and biomass) and ecological functions performed by dung beetles. We performed free choice tests with dung containing residues of Neem, Ivermectin and control, in eight introduced and eight native pastures. Both pasture system and veterinary pharmaceutical type affected all aspects of dung beetles community. Our findings highlight that veterinary pharmaceutical and pastures systems must to be considered as synergy factors for assess the risks of use veterinary pharmaceutical in non-target fauna. The conversion of native to exotic pastures, promotes a reduction in biodiversity but increase in abundance of dung beetles with high biomass. As a consequence of high abundance of large-bodied dung beetles, introduced pastures have higher taxa of dung burial and soil bioturbation contrasted with native systems. Also, dung with Ivermectin attracted more richness and total biomass of dung beetles in introduced pastures than in native, thus some species can be evolutionary selected to use resources with toxic residues. Overall the Neem plant has been successfully pass in the ecological tests with dung beetle community, they are most attracted to dung with residues and performed more dung burial and soil bioturbation and can be considered as a viable alternative to replace Ivermectin.

Key words: pesticides; habitat conversion; Scarabaeinae behaviour; free choice test.

Introduction

The rapid growth of human population leads to pressures for increase food supply. Nowadays it became a worldwide concern to not only improve food production but also promote sustainable management of agricultural lands. Brazil plays an important role in bovine meat market producing one third of the meat sold in the world (IBGE 2015; MAPA 2009). However, the currently modern cattle methods management are threatening by the irresponsible use of synthetic veterinary pharmaceutical that can cause human health problems and environmental damages (Costabeber et al. 2003; Liebig et al. 2010; [EMEA] European Medicines Agency 1997)

Although the assessment of environmental risks promoted by veterinary pharmaceutical use has recently increase (Liebig et al. 2010; Errouissi & Lumaret 2010), there are few studies considering the synergic interaction between technological changes in pasture systems and veterinary pharmaceutical use (Almeida 2010). The process of replacing native pastures with high biodiversity into exotic pastures of monocultures, known as “grass-to-grass conversion” affects negatively the non-target soil fauna (Almeida et al. 2011). With an understanding of the link between these issues, new approaches of cattle management can ally maintaining ecological functioning and biodiversity in pastures.

Dung beetles are an important group of insects, especially for the livestock management. Their behaviour of feeding and reproduction in livestock dung prevents dung accumulation in the pastures and controls helminth parasitism and flies (Nichols et al. 2008). However the remarkable role of dung beetles in cattle management, they have been neglected in the conventional management. For example, the mostly used veterinary pharmaceutical for nematodes and arthropods control, Ivermectin, after its world introduction in the early 1980's, has been proved to cause several negative effects in non-target

fauna of different groups from dung beetles to humans (Scholtz & Jacobs 2010; Costabeber et al. 2003), but still worldwide spread.

The Neem plant (*Azadiracta indica* A. Juss, Meliaceae) is considered as a viable alternative to replace Ivermectin, due its properties against arthropods in pest control and no impact on human health (Luntz & Nisbet 2000; Broglio-Micheletti et al. 2010). Although examples in USA, Canada and Germany have establish Neem as a viable insecticide (Luntz & Nisbet 2000), its effects on non-target fauna remains untested. This plant produces azadirachtin a tetranortriterpenoid plant limonoid with potent insect feed deterrent effect and, if consumed, cause growth disrupting effects (Mordue & Blackwell 1993; Luntz & Nisbet 2000), negative affect on cellular process (Luntz & Nisbet 2000), and reduce reproduction (Ascher 1993; Hussein et al. 2005).

Here we used field experiments, both in native and in introduced pastures to investigate the consequences of a natural (Neem plant extracted) and a synthetic (Ivermectin) veterinary pharmaceutical in community attributes (richness, abundance, composition and biomass) and ecological functions performed by dung beetles. Our hypotheses test are: i) The conversion of native pasture in introduced negatively affect the dung beetles community; ii) Dung beetles will choice dung without Neem and Ivermectin residues; iii) Residues of veterinary pharmaceutical reduce the ecological functions performed by dung beetle communities (dung burial and soil bioturbation); iiiii) Residues reduces the biodiversity attributes of dung beetles attracted.

Methods

Study site

The experiment was conducted in the municipality of Carrancas, South Minas Gerais state, Brazil, (21°28'24" S, 44°39'05"W), in the Cerrado biome which is a complex mosaic of native pasture (campo limpo), savanna (cerrado

sensu strictu) to semi-deciduous forest (Cerradão) (Oliveira & Marquis 2002). The climate is Cwa according to Köppen classification and with approximately 1480 mm mean annual precipitation and of 15°C mean annual temperature (Oliveira-Filho et al. 2004).

With the allegation increase the pasture productivity in low fertility and acid soils in Cerrado (Martha Júnior & Vilela 2002), thru the last 40 years, the Brazilian government provides incentives for the conversion of native pastures to introduced pastures mostly using *Brachiaria* (formally *Urochloa* genus).

Dung collection

We used thirty adult bovines in order to produce dung of the three treatments levels. Ten cows were exposed to subcutaneous injections of 1% Ivermectin solution; another ten fed with a mixture of 1:100 kg of Neem and mineralized salt, and ten as control not exposed to any veterinary products. The treatment with Neem started two weeks before dung collection, as this was the activation period for pest control indicated on the product label. The dung with Ivermectin was collected proximally after one week of Ivermectin application. All dung samples was collected fresh from multiple pats, mixed, and then frozen in -5°C (Errouissi & Lumaret, 2010). The dung was defrosted one day before being used in the experiments.

Ecological functions test

The experiment was carried out in January and February of 2014, in sixteen pastures half in introduced (*Urochloa* sp.) and other half in native pastures. We performed a free choice test with three repetitions in each pasture. At each pasture we set three arenas cluster in a triangle form, with each cluster composed of three traps calls “arena” which is a circular plot, 1 m in diameter

with a 20cm high net placed at soil level with bamboo sticks to limit the movements of dung beetles, and in the center we put 500g of fresh dung with the three treatments (Neem, Ivermectin and control). Thus for each pasture sampled we have nine arenas, three of each treatment, the sequence of treatments in each angle was randomized. In order to have a control of humidity loss of dung, we put in the center of the triangle another 500g sample of dung of the three treatments (Neem, Ivermectin and control) covered with a net to avoid flies attacks which would overweight our humidity control (Figure 1). We considered the final weight of humidity control as the percentage of water lost and use to correct the values of dung burial in each treatment. After 48h we measured the amount of dung removed and the soil bioturbation (excavated soil) performed by dung beetles. In total, there were 162 arenas in our study.

Biodiversity tests

Dung beetles biodiversity were sampled using pitfall traps (19cm diameter, 11cm depth) buried flush in the ground and filled with saline solution and few drops of detergent. Each trap was baited with 500 g of cattle dung of three treatments (Neem, Ivermectin and control). We used the same sample design of ecological functions tests, after 48h we collected the dung beetles trapped. All specimens were sorted and identified at Universidade Federal de Lavras by using the reference collection of Invertebrate Ecology and Conservation Laboratory. In total, there were 162 pitfall traps in our study.

Statistical analyses

We used generalized linear mixed models (GLMM, Bolker *et al.* 2009) for dung attractiveness, ecological functions and biodiversity parameters such richness, abundance and biomass comparisons, using these variables as response with treatments and land use as explanatory variables and “area” as random effect. Poisson and quasi-poisson error structure were adopted. All analyses

were performed using R v3.2.0 (R Core Team 2015). GLMMs using the *lme4* package v1.1-7.

To determine whether species composition varies between the treatments and pastures systems we performed Permutational multivariate analyses of variance (PERMANOVA) with 9,999 permutations. These analyses were based on Bray–Curtis similarity, using standardized and square root transformed abundance data and were performed using the software Primer v.6 with PERMANOVA+ (Anderson et al., 2008; Clarke and Gorley, 2009).

We used the Indicator Value (IndVal) analysis (Dufrene & Legendre 1997) to identify the indicator species of each treatment (Neem, Ivermectin and control) and pasture system. Significant IndVal scores suggest that a given taxon is an indicator of a variable when contrasted with a Monte Carlo randomization procedure (4999 randomizations). IndVal analysis was implemented in PC-ORD5 (McCune & Mefford 2006).

Results

Dung attractiveness and biodiversity

We collected 6495 dung beetles belonging to 42 species. In general, in native pastures we collected 2752 individuals of 39 species; in introduced pastures we collected 3743 individuals of 29 species. Traps containing dung with Neem residues collected 3019 individuals of 38 species, Ivermectin ones collected 2190 individuals of 32 species; and control traps collected 1286 individuals of 25 species (Table 1).

The treatments influence dung beetle's abundance ($\chi^2= 988.73$, $p < 0.001$) species richness ($\chi^2=74.354$, $p < 0.001$) and biomass ($F= 70.81$, $p < 0.001$). Pasture systems influence abundance ($\chi^2= 200.37$, $p < 0.001$) and species richness ($\chi^2= 34.45$, $p < 0.01$), with a significant interaction between both

variables for abundance ($\chi^2 = 44.71$, $p < 0.001$), species richness ($\chi^2 = 8.23$, $p < 0.01$) and biomass ($F = 6.60$, $p < 0.01$) (Figure 3). Dung with Ivermectin attracted more species ($\chi^2 = 6.0$, $p < 0.05$) in introduced pastures, with no statistical differences between Neem and control dungs. In native pastures the richness was higher in dung with Neem ($\chi^2 = 15.32$, $p < 0.001$), with no statistical difference between Ivermectin and control. For dung beetle biomass we found in introduced pastures higher values in Ivermectin dung ($F = 21.82$, $p < 0.001$), followed by Neem ($F = 4.33$, $p < 0.01$). No statistical differences were found in the biomass attracted to the treatments in native pastures. Abundance of dung beetles is higher in Neem dung in introduced ($\chi^2 = 6.37$, $p < 0.01$) and native ($\chi^2 = 119.79$, $p < 0.001$) compared to control dung.

Ecological functions

We found a significant difference in dung burial ($\chi^2 = 1694.3$, $p < 0.001$) and soil bioturbation ($\chi^2 = 1561.3$, $p < 0.001$) between all treatments, with significant interactions between treatment and pasture system for dung burial ($\chi^2 = 17.44$, $p < 0.001$) and soil bioturbation ($\chi^2 = 134.98$, $p < 0.001$) (Figure 2). In native pastures, a mean of 414.48 ± 82.29 g of dung was removed in Neem treatment, 358.24 ± 120.25 g in Ivermectin and 253.55 ± 123.6 g in control. The amount of soil excavated in Neem treatment was 299.91 ± 224.66 g, 296.29 ± 253.19 g in Ivermectin and 232.16 ± 186.89 g (mean) for control. In introduced pastures a mean of 443.54 ± 48.8 g of dung was removed in Neem treatment, 379.81 ± 114.25 g in Ivermectin and 294.18 ± 122.6 g in control. The amount of soil excavated for Neem treatment was 436.95 ± 190.07 g, 422.66 ± 217.93 g in Ivermectin and 261.33 ± 167.85 g for control.

Species composition

Dung beetle composition differs in all treatments between pasture systems (Neem ($t= 3.295$, $p < 0.001$), Ivermectin ($t= 2.4728$, $p < 0.001$), and control ($t= 1.9393$, $p < 0.003$). In native pastures there is a difference in dung beetle composition for all pairwise comparisons of the treatments, in Neem and control ($t= 2.1863$, $p < 0.001$); Ivermectin and control ($t= 0.6008$, $p= 0.918$); and Neem and Ivermectin ($t= 2.0454$, $p < 0.001$). In introduced pastures there is no difference between treatments Neem and control ($t= 0.82864$, $p= 0.573$); Ivermectin and control ($t= 1.0197$, $p= 0.342$) and Neem and Ivermectin ($t= 1.5113$, $p= 0.076$).

Twelve species were mostly attracted to one dung treatment considered indicators of this type of dung. In Neem dung (*Canthidium decoratum*, *Canthidium barbaticum*, *Canthon lamproderes*, *Canthon quadripunctatum*, *Coprophanaeus horus*, *Deltochillum elevatum*, *Dichotomius nisus*, *Phanaeus kirby*, *Phanaeus palaeno*, *Trichillum adjuntum*) and two for Ivermectin (*Dichotomius bos*, *Isocoprins inhatus*) were considered as indicators. Indicator species were also observed for pasture systems. Native pastures presented nine species indicators (*Ateuchus puncticollis*, *Ateuchus vividus*, *Canthon aff. unicolor*, *Canthon lamproderes*, *Canthidium barbaticum*, *Deltochillum elevatum*, *Dichotomius crinicollis*, *Phanaeus kirby* and *Trichillum adjuntum*) and just three indicator species were observed for introduced pastures (*Dichotomius bos*, *Sulcophanaeus menelas* and *Trichillum externepunctatum*).

The most abundant species was *Onthophagus aff. hircullus* with 2051 individuals collected, 1512 in native and 539 in introduced pastures. In introduced pastures others species with remarkably abundance were *Dichotomius bos* with 1692 individuals and *Dichotomius nisus* with 1120. *Dichotomius bos* was more abundant in introduced pastures with 1210 individuals collected and 482 in native pastures, *D. nisus* presented more

equitative populations in both systems 549 in introduced and 571 in native pasture.

Discussion

The management applied to cattle populations in Brazilian Cerrado alters all aspects of dung beetles community. Our findings highlight that veterinary pharmaceutical and pastures systems must be considered as synergic factors to assess the risks and damages of the use of veterinary pharmaceuticals in non-target fauna. Currently, the environmental risks assessment according to International Co-operation of Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medical Products perform studies with non-target fauna if the compound dose in the soil is above 0.1 mg kg^{-1} (VICH, 2000; 2004). However, there is no concern of pasture systems in standardization of field tests, which can underestimate the responses of dung beetle community to veterinary pharmaceuticals.

The conversion of native pastures to exotic ones, promotes environments less biodiverse but with large abundance of bigger dung beetles species. Also there was no difference in community composition between dung treatments in introduced pastures. As a consequence of a high abundance of large-bodied dung beetles, introduced pastures presented higher rates of ecological functions compared with native systems. For example, the paracoprid *Dichotomius bos* was the second most abundant dung beetle species in our study and was considered an indicator to introduced pastures. From the perspective of farmers the increase of burial dung and soil bioturbation in introduced pastures, despite losses in biodiversity is an advantage, although further studies concerning how this exotic ecosystem maintain itself in long terms must be encouraged.

Ivermectin dung in introduced pastures attracted higher richness and total biomass of dung beetles than in native pastures. These facts can be linked with the abundant presence of *Dichotomius bos* and the large *Isocopris inhatus* which one individual can weight more than 3 g, and were considered indicators of Ivermectin. Since in introduced pastures we found less richness of dung beetles than in introduced pastures, but mostly of species are attracted to Ivermectin dung, these species may have physiological mechanisms allowing them to handle with toxics compounds. Evidence of fat accumulation in *Dichotomius nisus* feeding in Ivermectin dung with no alteration in the behaviour of dung burial and soil bioturbation (Souza et al., 2016 submitted) and *Aphodius depressus* that increase the survival rate in dung with Ivermectin residues compared with free dung (Beynon et al. 2012), strongly suggest this proximate mechanism. In the other side Ivermectin can provoke decline of some dung beetles populations, for example recently was proved that small doses of Ivermectin decrease sensorial and locomotor capacity promoting negative consequences in the search for food or/and a mate in *Scarabaeus cicatricosus* Lucas (Verdú et al. 2015).

The high attraction of dung beetles by Neem dung was not expected, although we found ten species considered indicators of this treatment. The azadirachtin has deterrent effects which can vary among insects. Azadirachtin bind specifically with some deterrent cells in chemoreceptors and can block receptors of stimulate feeding (Luntz & Nisbet 2000; Mordue & Blackwell 1993). Perhaps the attraction of dung beetles to Neem is related to metabolization of azadirachtin by the cattle that currently have no data about how much is release in dung pats. Indeed the azadirachtin molecule can easily degraded by action of ultraviolet light (Luntz & Nisbet 2000) which dung pats can became easily free of residues. Tests with electroantennography can

highlight if the Neem presence in dung positively affects the olfactory sensory neurons in adult dung beetles.

Neem plant has been successfully approved in the ecological tests with dung beetle community and ecological functions. These insects are most attracted to dung with Neem residues and performed more dung burial and soil bioturbation. Thus, it can be considered as a viable alternative to replace Ivermectin. However, studies taking in account the reproduction and life cycle of dung beetles must be performed to completely attest the safety of Neem on non-target fauna. From an economic point of view, farmers can produce their own veterinary pharmaceutical reducing their costs and maintaining dung beetles community and ecosystem functioning.

Acknowledgements

We special thank Dona Fátima, Seu Chiquinho and their family for provision the cattle for the field experiments and all the farmers who allowed the collection of dung beetles in their properties. We are grateful to Luiza Gomide, Felipe Fernandes, Vanesca Korasaki, Nicolas Chaline, Cristiane Queiroz and Miltoninho for fieldwork assistance.

References

- [EMEA] European Medicines Agency. 1997. Environmental Risk Assessment for Gmo-Containing and Immunological. *Note for guidance: Environmental risk assessment for veterinary medicinal products other than GMO-containing and immunological products. London (UK)*, Final report, pp.265–308.
- ABIEC, Associação Brasileira das Industrias Exportadoras de Carne. 2016. *Rebanho Bovino Brasileiro*, p.http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp. Accessed in: 02 January, 2016.

- Almeida, S.S.P. 2010. O Uso de Escarabeíneos (Coleoptera) para Avaliação do Manejo Agropostaril no Cerrado. Thesis. *Universidade Federal de Viçosa*, pp - 1-92.
- Almeida, S., Louzada, J., Sperber, C., & Barlow, J. 2011. Subtle Land-Use Change and Tropical Biodiversity: Dung Beetle Communities in Cerrado Grasslands and Exotic Pastures. *Biotropica*, 43(6), p. 704-710.
- Alves, S. & Serrão, J. 2004. Effect of ivermectin on the life cycle and larval fat body of *Culex quinquefasciatus*. *Brazilian archives of biology and technology*, 47(3), pp.433–439.
- Andrades, T.O. & Ganimi, R.N. 2007. Revolução Verde e a Apropriação do Capital. *C E S Revista*, 21, pp.43–56.
- Ascher, K.R.S. 1993. Nonconventional insecticidal effects of pesticides available from the Neem tree, *Azadirachta indica*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 22(3-4), pp.433–449.
- Bastos, L.H.P.; Cardoso, M.H.W.M.; Nóbrega, A.W.; Jacob, S.C. 2010. Possíveis fontes de contaminação do alimento leite , por agrotóxicos, e estudos de monitoramento de seus resíduos : uma revisão nacional monitoring their residues : a Brazilian national review. *Caderno de Saúde Coletiva*, 19(1), pp.51–60.
- Beynon, S.A.; Mann, D.J. Slade, E.M.; Lewis, O.T. 2012. Species-rich dung beetle communities buffer ecosystem services in perturbed agro-ecosystems. *Journal of Applied Ecology*, 49, 1365–1372.
- Birkhofer, K.; Dieköttera, T.; Meuba, C.; Stötzela, K.; Wolterset, V. 2015. Optimizing arthropod predator conservation in permanent grasslands by considering diversity components beyond species richness. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 211, pp.65–72.
- Broglio-Micheletti, S.M.F.; Dias; N.S.; Valente; E.C.N.; Souza; L.A.; Lopes; D.O.P.; Santos, J.M. 2010. Ação de extrato e óleo de nim no controle de

- Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19(1), pp.44–48.
- Campbell, W.C. 1985. Ivermectin: an update. *Parasitology today (Personal ed.)*, 1(1), pp.10–6.
- Chagas, A.C.S. & Viera, L.S. 2007. Ação de *Azadirachta indica* (Neem) em nematódeos gastrintestinais de caprinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 44(1), pp.49–55.
- Clough, Y. Ekroos, J.; Báldi, A.; Batáry, P.; Bommarco, R.; Gross, N.; Holzschuh, A.; Hopfenmuller, S.; Knop, E.; Kuussaari, M.; Linborg, E.; Marini, L.; Ockinger, E.; Potts, S.G.; Poyry, J.; Roberts, S.P.M.; Steffan-Dewenter, I.; Smith, H.G. 2014. Density of insect-pollinated grassland plants decreases with increasing surrounding land-use intensity. *Ecology Letters*, 17(9), pp.1168–1177.
- Dadour, I.R.; Cook, D.F.; Neesam, C. 1999. Dispersal of dung containing ivermectin in the field by *Onthophagus taurus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Bulletin of Entomological Research*, 89 (02), pp.119–123.
- Galbiati, C.; Conceição, C.H.C; Florcovski, J.L.; Calafori, M.H.; Tobias, A.C.T. 1995. Efeito de vermífugos injetáveis em bovinos de leite sobre o besouro coprófago *Dichotomius anaglypticus* (MANN., 1829). *Ecosistema*, pp.100–108.
- Hussein, H.M.; Dimetry, N.; Zidan, Z.; Iss-hak, R. R.; Sehnaet, F. 2005. Effects of insect growth regulators on the hairy rose beetle, *Tropinota squalida* (Col., Scarabeidae). *Journal of Applied Entomology*, 129(3), pp.142–148.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2016. Projeção da população brasileira e das Unidades da Federação, p.<http://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/ind>. Accessed in: 02 january, 2016.

- Kao, L.; Motoyama, N.; Dauterman, W.C. 1984. Studies on Hydrolases in Various House Fly Strains and Their Role in Malathion Resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 92, pp.86–92.
- Liebig, M., Fernandez, Á.A.; Blübaum-Gronau, E.; Boxall, A.; Brinke, M.; Carbonell, G.; Egeler, H.; Fenner, K.; Fernandez, C.; Fink, G.; Garric, J.; Halling-Sørensen, B.; Knacker, T.; Krogh, K. A.; Küster, A.; Löffler, D.; Cots, M.Á.P.; Pope, L.; Prasse, C.; Römbke, J.; Rönnefahrt, I.; Schneider, M.K.; Schweitzer, N.; Tarazona, J.V.; Ternes, T.A.; Traunspurger, W.; Wehrhan, A.; Duisy, K. 2010. Environmental risk assessment of ivermectin: A case study. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 6(SUPPL. 1), pp.567–587.
- Lumaret, J.P.; Errouissi, F.; Floate, K.; Römbke, J.; Wardhaugh, K. 2012. A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(6), pp.1004–60.
- Lumaret, J.P. & Errouissi, F. 2002. Use of anthelmintics in herbivores and evaluation of risks for the non target fauna of pastures. *Veterinary Research*, 33(5), pp.547–562.
- Lumaret, J.P & Errouissi, F. 2010. Field effects of faecal residues from ivermectin slow-release boluses on the attractiveness of cattle dung to dung beetles. *Medical and Veterinary Entomology*, 24, 433–440.
- Luntz, A.J.M. & Nisbet, A.J. 2000. Azadirachtin from the Neem Tree *Azadirachta indica*: its Action Against Insects. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 29(4), pp.615–632.
- Martha Junior, G. B. & Vilela, L. 2002. Documento 50- Pastagens no Cerrado: baixa produtividade pelo uso limitado de fertilizantes. In *Embrapa Cerrados* (Ed.). Planaltina, DF, Brasil. 32pp.
- Mordue, A.J. & Blackwell, A. 1993. Azadirachtin : an Update. *Journal of Insect*

- Physiology*, 39(11), pp.903–924.
- Nichols, E. Spector, S.; Louzada, J.; Larsen, T.; Amezcuita, S.; Favila, M.E. 2008. Ecological functions and ecosystem services provided by Scarabaeinae dung beetles. *Biological Conservation*, 141(6), pp.1461–1474.
- Rodríguez-Vivas, R.I.; Pérez-Cogollo, L.C.; Rosado-Aguilar, J.A.; Ojeda-Chi, M.M.; Trinidad-Martinez, I.; Miller, R.J.; Li, A.Y.; Pérez De León, A.; Guerrero, F.; Klafke, G. 2014. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico. *Brazilian journal of veterinary parasitology : Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 23(2), pp.113–22.
- Scholtz, C.H. & Jacobs, C. 2010. A review on the effect of macrocyclic lactones on dung-dwelling insects: Toxicity of macrocyclic lactones to dung beetles. *Journal of Veterinary Research*, 82(1), pp.1–8.
- Silva, T.P.P.; Moreira, J.C.; Peres, F. 2012. Serão os carrapaticidas agrotóxicos? Implicações na saúde e na percepção de riscos de trabalhadores da pecuária leiteira. *Ciência & Saúde Coletiva*, 17(2), pp.311–325.
- Slade, E.M. Mann, D.J.; Villanueva, J.F.; Lewis, O.T. 2007. Experimental evidence for the effects of dung beetle functional group richness and composition on ecosystem function in a tropical forest. *Journal of Animal Ecology*, 76(6), pp.1094–1104.
- Verdú, J.R. Cortez, V.; Ortiz, A. J.; González-Rodríguez, E.; Martínez-Pinna, J.; Lumaret, J.P.; Lobo, J.M.; Numa, C.; Sánchez-Piñero, F. 2015. Low doses of ivermectin cause sensory and locomotor disorders in dung beetles. *Scientific reports*, 5, p.13912.
- Wesche, K. Krause, B.; Culmsee, H.; Leuschner, C. 2012. Fifty years of change in Central European grassland vegetation: Large losses in species richness and animal-pollinated plants. *Biological Conservation*, 150(1), pp.76–85.

Yu, S.J. & Nguyen, S.N. 2003. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm , *Spodoptera frugiperda* (J . E . Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77(1), pp.1–11.

Table 1. Abundance of dung beetles per pasture system and veterinary pharmaceutical treatment

Espécies	Introduced pasture			Native pasture		
	Cont	Iver	Neem	Cont	Iver	Neem
<i>Agamopus unguicularis</i>	1	10	5	1	3	6
<i>Agamopus viridis</i>	17	29	34	12	33	52
<i>Ateuchus puncticollis</i>	2	7	2	33	40	23
<i>Ateuchus</i> sp1	2	-	-	-	-	1
<i>Ateuchus striatulus</i>	10	10	1	6	8	7
<i>Ateuchus subquadratus</i>	2	2	1	-	1	-
<i>Ateuchus vividus</i>	1	3	7	8	33	23
<i>Atheuchus vividus</i>	-	-	-	-	-	2
<i>Canthidium barbaticum</i>	-	-	1	2	-	9
<i>Canthidium decoratum</i>	5	3	52	9	5	70
<i>Canthidium impressum</i>	-	-	-	1	-	-
<i>Canthidium</i> sp1	1	2	3	-	-	6
<i>Canthon aff. dives</i>	-	-	-	-	1	4
<i>Canthon aff. unicolor</i>	-	-	-	-	10	17
<i>Canthon lamproderes</i>	-	-	-	13	19	48
<i>Canthon lituratus</i>	-	1	1	-	-	-
<i>Canthon ornatus</i>	-	-	-	-	-	1
<i>Canthon podagricus</i>	-	1	1	-	-	-
<i>Canthon quadripunctatus</i>	-	-	1	-	1	4
<i>Canthon virens</i>	-	-	-	-	2	3
<i>Coprophanæus horus</i>	-	-	1	-	-	2
<i>Deltochillum elevatum</i>	-	-	-	-	1	11
<i>Deltochillum septentriatum</i>	-	-	-	1	-	3
<i>Dendropaemon</i> sp1	-	2	-	-	-	-
<i>Dichotomius aff. ingens</i>	-	1	-	-	-	1
<i>Dichotomius asiffer</i>	-	-	-	-	1	-
<i>Dichotomius bos</i>	300	562	348	157	187	138
<i>Dichotomius crinicollis</i>	3	-	2	3	6	7
<i>Dichotomius nisus</i>	99	163	287	97	116	358
<i>Dichotomius semianeius</i>	2	4	7	6	2	9
<i>Dichotomius</i> sp1	-	1	1	-	-	2
<i>Dichotomius</i> sp2	-	-	-	-	-	1

<i>Generidium bidens</i>	-	-	-	1	-	1
<i>Isocoprís inhatus</i>	6	19	5	14	29	6
<i>Ontherus appendiculatus</i>	-	-	-	-	-	3
<i>Onthophagus aff. hirculus</i>	299	438	775	129	149	261
<i>Oxysternon palaeno</i>	-	-	-	-	3	-
<i>Phanaeus kirbyi</i>	-	-	2	1	3	13
<i>Phanaeus palaeno</i>	-	-	5	1	1	7
<i>Sulcophanaeus menelas</i>	7	4	2	-	-	1
<i>Trichillum adjunctium</i>	13	19	61	12	216	269
<i>Trichillum externepunctatum</i>	9	36	38	-	3	3
<i>Trichillum heydeni</i>	-	-	1	-	-	1

Figure 1: Sampling design of the free choice test performed in introduced and native pastures.

Figure 2: Means and standard errors of (a) dung burial and (b) soil bioturbation in dung with veterinary pharmaceutical treatments (Neem, Ivermectin and control) for Introduced pastures (gray bars) and Native pastures (black bars). Small letters represent tests between dung treatments in the same pasture system and also in the same treatment between pasture systems. Capital letters represent the free choice test between veterinary pharmaceuticals in the same pasture system. Bars that do not have similar letters have significantly different means. I= introduced pastures; N= native pastures; Iver= Ivermectin, Cont=control.

Figure 3: Means and standard errors of (a) richness, (b) abundance, and (c) biomass in dung beetles for Introduced pastures (gray bars) and Native pastures (black bars) among treatments (Neem, Ivermectin and control), collected in the free choice test. Small letters represent tests between dung treatments in the same pasture system and also in the same treatment between pasture systems. Capital letters represent the free choice test between veterinary pharmaceuticals in the same pasture system. Bars that do not have similar letters have significantly different means. I= introduced pastures; N= native pastures; Iver= Ivermectin, Cont=control.

Figure 1.

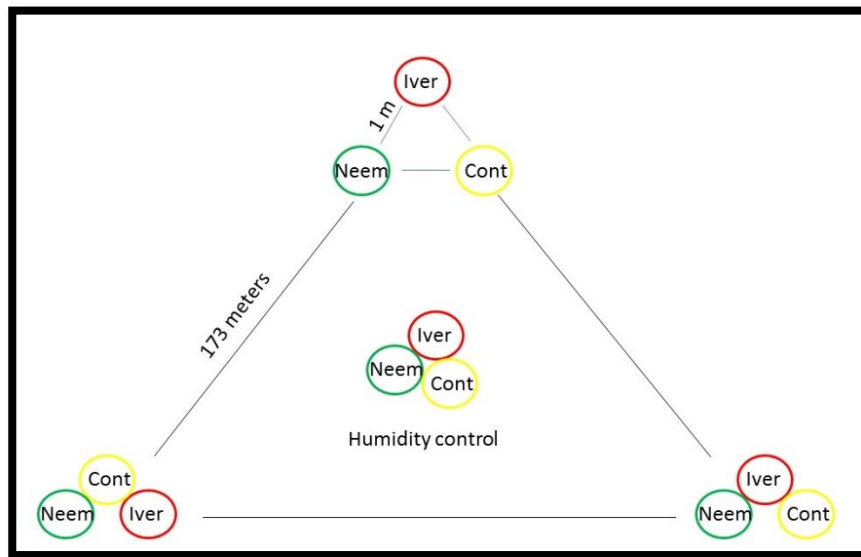


Figura 2.

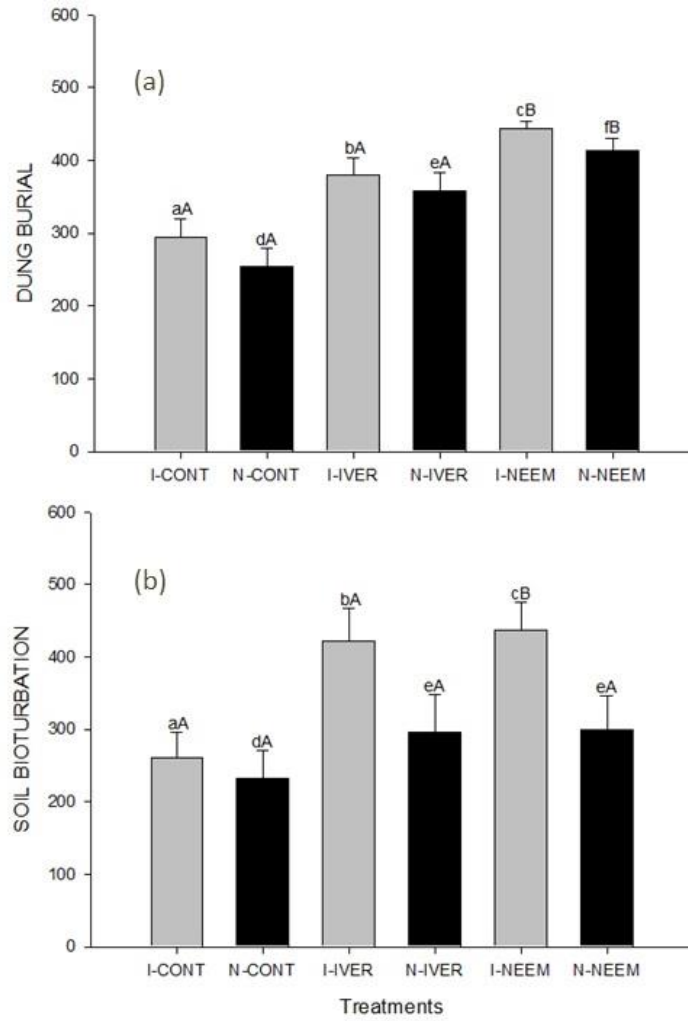
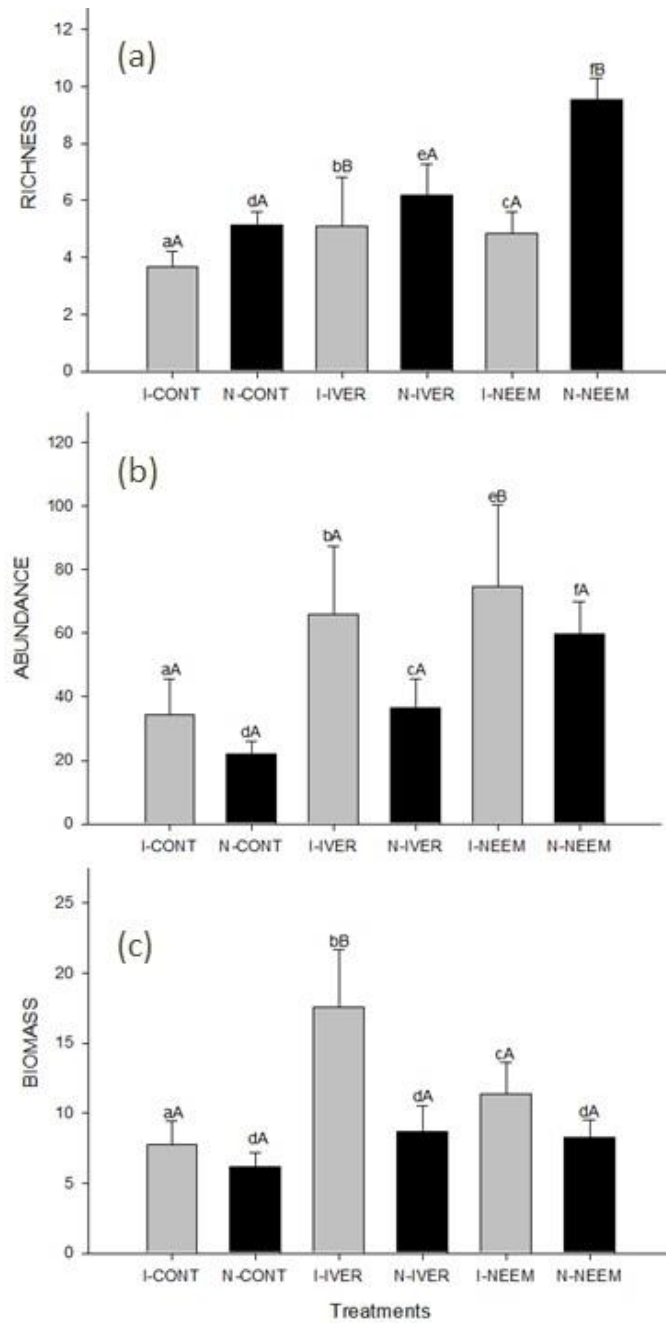


Figure 3.



CAPÍTULO 2:

The influence of veterinary pharmaceutical residues on dung beetle behaviour and physiology: does Neem trigger the same response as Ivermectin?

Authors: Agnis Cristiane de Souza^{1*¶#a}, Ronara de Souza Ferreira^{2¶}, Nicolas Châline^{4&}, Vanesca Korasaki^{6&}, Wallace Beiroz^{3,5&}, Julio Louzada^{1,3,5¶}

Author affiliations:

¹ Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

² Departamento de Biologia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brazil.

³ Departamento de Biologia, Setor de Ecologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Laboratório de Etologia, Ecologia e Evolução de Insetos Sociais, Departamento Experimental de Psicologia, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁵ Lancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster, Lancashire, UK.

⁶ Departamento de Ciências Exatas da Terra, Universidade Estadual de Minas Gerais, Frutal, Minas Gerais, Brazil.

* Corresponding author, email: souzabio.agnis@gmail.com

¶ These authors contributed equally to this work.

& These authors also contributed equally to this work.

^{#a}Current Address: Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras,
Minas Gerais, Brazil.

Abstract

Ivermectin is a synthetic veterinary pharmaceutical widely used to control endo and ectoparasites in livestock. Its potential negative effects on non-target fauna, requires looking for sustainable alternatives. In this context, the Neem plant (*Azadirachta indica* A. Juss) has been suggested as a viable and more ecological alternative to replace Ivermectin. However, little is known about the effects of both these veterinary pharmaceutical residues on the behaviour and physiology of non-target fauna, especially on dung beetles (Coleoptera: Scarabaeinae) that use livestock dung as a feeding and nesting resource. In order to understand such effects, we performed a non-choice laboratory test using *Dichotomius nesus* Oliver, 1798 a dung beetle species widely found in Brazilian pastures. We evaluated in controlled conditions the effects of veterinary pharmaceutical residues (Ivermectin and Neem) on the ecological functions of dung burial and soil bioturbation performed by dung beetles. Additionally, we performed Soxhlet extraction of the dung beetles fat amount in order to evaluate the physiological status of adult dung beetles exposed to the different types of residues. Our results show that *D. nesus* do not alter their behaviour in the presence of Ivermectin and Neem residues when compared with control, but that the individuals exposed to Ivermectin for a period of twenty days have five % more fat. Our findings stresses the need for multiple tests (i.e. ecology, behaviour and physiology) to assess the risks of veterinary pharmaceuticals in non-target fauna. In addition our work highlights the need for more research about the physiological responses of dung beetles to veterinary pharmaceutical residuals.

Introduction

The Brazilian territory harbours more cattle than humans, with the biggest commercial population in the world [1,2]. The management of cattle became the subject of a recent global discussion about the effects of pesticides used for pest control. In the 90's, The European Union started a program to assess the environmental risks caused by pesticides classified as veterinary pharmaceuticals or veterinary medicinals, and aimed at identifying ways to minimize their associated risks [3,4].

Ivermectin is a veterinary pharmaceutical used worldwide, since the 80's, to control nematodes and arthropods that affect cattle [5,6]. Ivermectin is a macrocyclic lactone that acts on signal transmission in neural and muscular cells, causing paralysis and death [3,5]. However, resistance of the target fauna to Ivermectin exists [7,8] and lethal and sub lethal effects have been described in non-target fauna [3,9]. Apart from the agronomic issue, neglect of the pesticide grace period (i.e. the time between pesticide application and slaughter) increased the likelihood of Ivermectin residues being found in the milk and meat, a potential cause of human diseases [10,11].

The plant Neem (*Azadiracta indica* A. Juss, Meliaceae) has been proposed as a viable alternative to commercial pesticides because of its effects against nematodes and arthropods [12,13]. The Neem active substance, azadirachtin, a tetracyclic terpenoid plant limonoid, is a potent insect feeding deterrent and, if consumed, causes growth disrupting effects [14], and reduced reproduction [15,16].

The use of synthetic or natural veterinary pharmaceuticals in cattle management can potentially affect the functioning of the agroecosystem. The effects can translate in the reduction of the population not only of the target fauna but also of the non-target fauna [9]. Arthropod populations that can be

affected are mostly involved in ecological functions such as pollination [17,18], decomposition [9] and predation [19]. Dung beetles are a relevant group for the decomposition function in natural as well as anthropic environments. These insects use dung to feed and for reproduction. Their behaviour of burying dung results in soil bioturbation enhancing soil physical properties, and helping to control flies and nematodes of veterinary importance [20].

Ivermectin residues can be lethal and sub-lethal for dung beetles in different stages of development, affecting dung attraction and decomposition and community structure [9,21]. However, there are few studies about the effects of Ivermectin on the ecological functions performed by adult dung beetles [22–24], and on the physiology of these insects [25]. Besides, the effects of Neem residues on dung beetles and all soil fauna should also be tested to prove their viability as a natural and ecological veterinary pharmaceutical.

In this study we tested the behaviour of *Dichotomius nisus* Olivier, 1789, a large tunneler dung beetle abundant both in exotic and native pastures in Brazil. It is considered one of the most important dung beetle species performing ecological functions of dung removal and soil bioturbation in pasturelands in Brazil [26]. In addition, we evaluated the dung beetles fat body content, an essential resource for the insects which serves multiples functions and used this measure as a proxy of stress exposure.

Methods

Dung beetles collection

Dung beetles were collected in introduced pastures in March 2014 in the municipality of Carrancas, South Minas Gerais state, Brazil, (21°28'24" S, 44°39'05"W). We captured live dung beetles using 50 randomly-distributed pitfall traps baited with human dung (50 g). The dung was placed in a plastic cup

suspended above the pitfall trap. Each trap consisted of a plastic container (20 cm deep, 13 cm in diameter) buried in the ground and filled up to a quarter with a soil and litter mixture, to provide a substrate for beetles and avoid their death. The *D. nisus* individuals were brought to the Laboratory of Invertebrate Ecology and Conservation at the Federal University of Lavras, and maintained at 29 ± 2 °C, 70 ± 10 % RH and a 12:12 h L:D photoperiod.

Dung collection

We used thirty adult bovines in order to collect dung for the three treatments. Ten cows were exposed to subcutaneous injections of 1% Ivermectin solution; another ten fed with one kilo of Neem for one hundred of mineralized salt, and ten as a control not exposed to any veterinary products. The treatment with Neem started two weeks before dung collection, as this was the activation period for pest control indicated on the product label. All collected dung was brought to the laboratory and maintained in sealed containers at -5 °C. The dung was defrosted one day before being used in the experiments.

Experimental design

To test if the presence of Ivermectin and Neem residues in the dung reduced the ecological functions of dung burial and soil bioturbation by *D. nisus*, a non-choice test with 18 replicates per treatment level (Ivermectin, Neem and control) was carried out in the laboratory. Each replicate consisted of a plastic bucket filled with 6 kg of soil, 500 g of bovine dung and 5 unsexed individuals of *D. nisus* exposed to treated and untreated dung for 48 h. We weighed both the remaining dung and the soil removed due to soil excavation. To control the effect of dung humidity loss in dung burial records, we installed four replicates per treatment without beetles. We used the ratio of initial to final weight after 48

h as a humidity loss percentage parameter to correct the values associated with dung beetle activity.

Beetles' Fat extraction

After the ecological functions analysis, we continue to evaluate ten replicates of each treatment (Ivermectin, Neem and control) with the same five individuals, so they could feed on treated dung over a longer period. After this period we evaluated the total amount of fat in the body in order to test the effect of treated and untreated dung on fat storage. After 20 days the dung beetles were collected, frozen and sent to the Laboratory of Oils, Fats and Biodiesel (G-Oil) - UFLA. We performed a continuous extraction processes using Soxhlet type extractors and hexane (C_6H_{14}) as solvent. Each replicate of the different treatments was individualized and the five beetles per replicate were weighted before fat extraction, totalling 105 samples. The samples remained at least 4 hours in the extractor apparatus at a temperature of over $69^{\circ}C$ (hexane boiling point). Samples were dried in a drying oven at $60^{\circ}C$ for one day and were then weighed again. To determine the amount of fat, we use the following formula: $(1 - (\text{initial weight} - \text{weight of the fat extracted}) / \text{initial weight})$.

Statistical analyses

We used Poisson Generalized Linear Models (GLM) to analyze whether there were differences in the ecological functions of burial of dung and soil bioturbation in the treatments, using both variables as response with treatment as category variable. We also used generalized linear mixed models (GLMM) to evaluate the difference in the accumulation of fat body of dung beetles in the different treatments using "repetition" as random effect. Binomial error structure was used due to proportion data. All analyses were performed using R v3.2.0 (R Core Team 2015) using the *lme4* package v1.1-7.

Results

Ecological functions

We did not observe any difference in dung burial ($F = 0.167$, $d.f.=1$ $p = 0.84$) and soil bioturbation ($F= 0.692$, $d.f.=1$ $p = 0.50$) performed by *D. nesus* in the Ivermectin, Neem, and control treatments. Mean dung burial and standard deviation was 190.53 ± 78.50 g for control, 184.29 ± 89.43 g for Ivermectin treatment and 175.71 ± 63.26 g for Neem treatment. The mean soil bioturbation was 295.50 ± 77.55 g for control, 327.22 ± 85.64 g for Ivermectin, and 315.31 ± 73.21 g for Neem.

Fat body proportion

We found a significant difference in the fat accumulation by *D. nesus* between treatments ($\chi=16.712$, $p < 0.001$; Figure 1). The mean value of fat proportion and standard deviation was $55.34\pm 13.49\%$ for control, $60.25\pm 13.25\%$ for Ivermectin, $56.69\pm 8.6\%$ for Neem. *D. nesus* individuals exposed to Ivermectin residuals exhibited higher fat amount than individuals exposed to dung contaminated with Neem residues or control treatment.

Discussion

Our results show that *D. nesus* dung beetles do not alter their behaviour of dung burial and soil bioturbation in the non-choice test in laboratory conditions, even using food resources contaminated with synthetic or natural pesticides. However, dung beetles exposure to Ivermectin contaminated dung for twenty days led to a significant increase in the total amount of fat. Our work provides the first record of a fat increase caused by Ivermectin in adult dung beetles and stresses the need for multiple tests (i.e. ecology, behaviour and

physiology) to a broader assessment the risks of veterinary pharmaceuticals in non-target fauna in the agroecosystems.

The non-variant behaviour of *D. nesus* in the laboratory regarding to the non-choice tests leads to two hypothesis. First, the residues are not detected by *D. nesus* permitting the specie use the resource as if there were no toxic compound in the dung. One species of the same genus, *Dichotomius bos*, has shown a decreased dung burial action in the presence of Ivermectin residues in 48 hour in a non-choice test [24]. Also, *Scarabaeus cicatricosus* decrease the activity of antennal olfactory apparatus with ingestion of low doses of Ivermectin residues in dung [25]. Next studies must concern in evaluating the interspecific variation of dung beetles response to Ivermectin comparing which characteristics could explain the distinct behaviour. We know so far that Neem pie in the Since there is no information about the amount of azadirachtin residues released in cattle dung, the quantity of the azadirachtin present in the dung maybe not cause any short-time effects on adult behaviour.

Second, the presence of residues does not change the use of the resource. The same behaviour but with an increase in fat amount can be a characteristic that is making it less susceptible and allowing use resource with toxic compounds. The dung beetles can be selected to use the resource available, since non-choice test simulates what is found in the field: dung only with Ivermectin residues. This fact can be related to dung with Ivermectin residues attracted more richness and total biomass of dung beetles than free residues dung and with Neem in the same region were we collected the *D. nesus* (Souza et al. 2016, unpublished).

The 5% increase of accumulated fat in dung beetles in contact with Ivermectin residues can be related to the detoxification mechanisms promoted by insect fat body. Insects that are resistant to pesticides have high activity of detoxification enzymes promoting toxic immobilization in fat body [27–29].

Further studies about the physiology of dung beetles fat body and detoxification enzymes activity can help to better understand the responses to Ivermectin.

Ivermectin residues affected the physiology of *D. nesus*, but it is not known if differences in fat accumulation affect negatively or not the dung beetle populations; and this finding call attention to a key knowledge gap. In 2014, the Brazilian government banned the use of macrocyclic lactones with concentrations over 1%, due to the presence of residues above the safety limit for human consumption. Neem may offer an alternative for farmers due to its apparent lack of negative effects on dung beetles with the recommended use. Nonetheless further field tests evaluating the responses of dung beetle communities to the use of Neem would provide a better assessment of the safety of use.

Conclusion

The assessment of the risks associated to Ivermectin use on non-target fauna such as dung beetles should combine multiple level tests encompassing ecology, behaviour and physiology. Ivermectin causes distinct responses in *D. nesus* with no effect on their behaviour but an increase in fat amount. Our findings provide the first evidence that the use of Neem do not affect the behaviour or fat amount of adults of *D. nesus* and suggest it can be an alternative to the use of Ivermectin.

Acknowledgements

We are indebted to the invaluable support of our field assistants and the farmers who allowed we perform the distinct treatments in the cattle. Special thanks to the Laboratory of Oils, Fats and Biodiesel (G-Oil) – UFLA for help with fat analyses.

References

1. ABIEC Associação Brasileira das Industrias Exportadoras de Carne. Rebanho Bovino Brasileiro. 2016. (Accessed 2 January 2016) http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp.
2. IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeção da população brasileira e das Unidades da Federação. 2016. (Accessed 2 January 2016) <http://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/ind>.
3. Liebig M, Fernandez ÁA, Blübaum-Gronau E, Boxall A, Brinke M, Carbonell G. Environmental risk assessment of ivermectin: A case study. *Integr Environ Assess Manag*. 2010; 6: 567–587. doi:10.1002/ieam.96
4. [EMEA] European Medicines Agency. Environmental Risk Assessment for Gmo-Containing and Immunological. Note Guid Environ risk Assess Vet Med Prod other than GMO-containing Immunol Prod London. 1997; Final report: 265–308.
5. Campbell WC. Ivermectin: an update. *Parasitol Today*. 1985; 1: 10–6. doi:10.1016/0169-4758(85)90100-0
6. Lumaret JP, Errouissi F. Use of anthelmintics in herbivores and evaluation of risks for the non target fauna of pastures. *Vet Res*. 2002; 33: 547–562. doi:DOI 10.1051/vetres:2002038
7. Rodríguez-Vivas RI, Pérez-Cogollo LC, Rosado-Aguilar JA, Ojeda-Chi MM, Trinidad-Martinez I, Miller RJ, et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2014; 23: 113–22. doi:10.1590/S1984-29612014044
8. Osei-Atweneboana MY, Awadzi K, Attah SK, Boakye DA, Gyapong JO, Prichard RK. Phenotypic Evidence of Emerging Ivermectin Resistance in *Onchocerca volvulus*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(3): e998. doi:10.1371/journal.pntd.0000998
9. Scholtz CH, Jacobs C. A review on the effect of macrocyclic lactones on dung-dwelling insects: Toxicity of macrocyclic lactones to dung beetles. *Onderstepoort J Vet*. 2010; 1–8. doi:10.4102/ojvr.v82i1.858

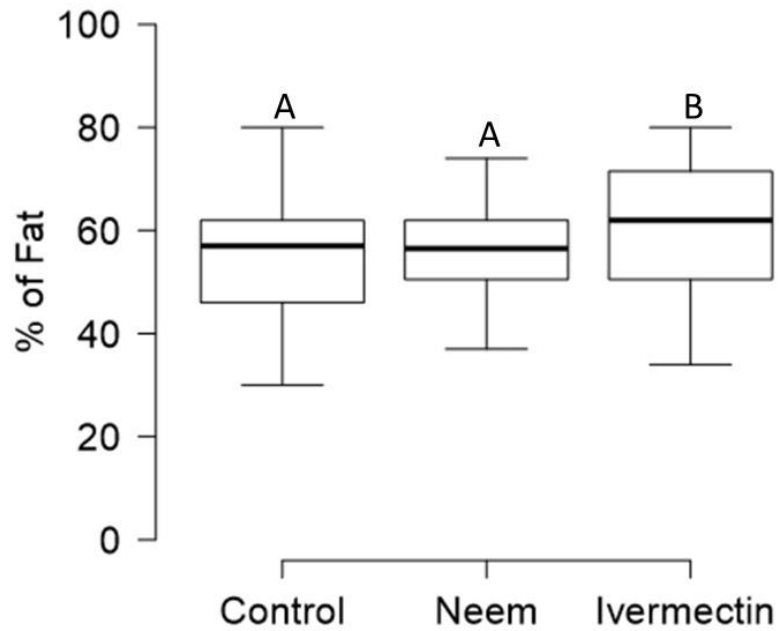
10. Silva TPP, Moreira JC, Peres F. Serão os carrapaticidas agrotóxicos? Implicações na saúde e na percepção de riscos de trabalhadores da pecuária leiteira. *Ciênc. Saúde Coletiva*. 2012; 17(2): 311-325. doi:10.1590/S1413-81232012000200006
11. Bastos, L.H.P.; Cardoso, M.H.W.M.; Nóbrega, A.W.; Jacob, S.C. Possíveis fontes de contaminação do alimento leite , por agrotóxicos, e estudos de monitoramento de seus resíduos : uma revisão nacional monitoring their residues : a Brazilian national review. *Caderno de Saúde Coletiva*. 2010; 19(1), pp.51–60.
12. Chagas AC de S, Viera L da S. Ação de *Azadirachta indica* (*Neem*) em nematódeos gastrintestinais de caprinos. *Braz J vet Res anim Sci*. 2007; 44: 49–55.
13. Broglio-Micheletti SMF, Dias N da S, Valente ECN, Souza LA, Lopes DOP, Santos JM. Ação de extrato e óleo de nim no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. *Rev Bras Paras Vet*. 2010; 19:44–48. doi:10.1093/jme/tjv149
14. Mordue AJ, Blackwell A. Azadirachtin : an Update. *J. Insect Physiol*. 1993; 39(11): 903-924 doi:10.1016/0022-1910(93)90001-8.
15. Ascher KRS. Nonconventional insecticidal effects of pesticides available from the Neem tree, *Azadirachta indica*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 1993; 22: 433–449. doi:10.1002/arch.940220311
16. Hussein HM, Dimetry N, Zidan Z, Iss-hak RR, Sehnal F. Effects of insect growth regulators on the hairy rose beetle, *Tropinota squalida* (Col., Scarabeidae). *J Appl Entomol*. 2005; 129: 142–148. doi:10.1111/j.1439-0418.2005.00891
17. Clough Y, Ekroos J, Báldi A, Batáry P, Bommarco R, Gross N, et al. Density of insect-pollinated grassland plants decreases with increasing surrounding land-use intensity. *Ecol Lett*. 2014; 17: 1168–1177. doi:10.1111/ele.12325
18. Wesche K, Krause B, Culmsee H, Leuschner C. Fifty years of change in Central European grassland vegetation: Large losses in species richness and animal-pollinated plants. *Biol Conserv*. Elsevier Ltd; 2012; 150: 76–85. doi:10.1016/j.biocon.2012.02.015

19. Birkhofer K, Diekötter T, Meub C, Stötzel K, Wolters V. Optimizing arthropod predator conservation in permanent grasslands by considering diversity components beyond species richness. *Agric Ecosyst Environ*. Elsevier B.V.; 2015; 211: 65–72. doi:10.1016/j.agee.2015.05.014
20. Nichols E, Spector S, Louzada J, Larsen T, Amezquita S, Favila ME. Ecological functions and ecosystem services provided by Scarabaeinae dung beetles. *Biol Conserv*. 2008; 141: 1461–1474. doi:10.1016/j.biocon.2008.04.011
21. Beynon SA, Peck M, Mann DJ, Lewis OT. Consequences of alternative and conventional endoparasite control in cattle for dung-associated invertebrates and ecosystem functioning. *Agric Ecosyst Environ*. 2012; 162: 36–44. doi:10.1016/j.agee.2012.08.010
22. Almeida SSP. O Uso de Escarabeíneos (Coleoptera) para Avaliação do Manejo Agropostaril no Cerrado. Thesis, Universidade Federal de Viçosa. 2010. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
23. Dadour IR, Cook DF, Neesam C. Dispersal of dung containing ivermectin in the field by *Onthophagus taurus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Bull Entomol Res*. 1999; 89: 119–123. doi:10.1017/S000748539900019X
24. Galbiati C, Conceição CH., Florcoski J., Calafiori M., Tobias AC. Efeito de vermífugos injetáveis em bovinos de leite sobre o besouro coprófago *Dichotomius anaglypticus* (MANN., 1829). *Ecosistema*. 1995; 100–108.
25. Verdú JR, Cortez V, Ortiz AJ, González-Rodríguez E, Martínez-Pinna J, Lumaret J, et al. Low doses of ivermectin cause sensory and locomotor disorders in dung beetles. *Sci Rep*. Nature Publishing Group. 2015; 5: 13912. doi:10.1038/srep13912
26. Gomide LA. Funções ecológicas de besouros rola-bosta (Scarabaeidae: Scarabaeinae): contribuição individual e específica para o funcionamento do ecossistema. 2015. Master Dissertation, Universidade Federal de Lavras.
27. Yu SJ, Nguyen SN. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pest Biochem Physiol*. 2003; 77: 1–11. doi:10.1016/S0048-3575(03)00079-8
28. Alves S, Serrão J. Effect of ivermectin on the life cycle and larval fat body of

- Culex quinquefasciatus*. Braz Arch Biol Techn. 2004; 47: 433–439.
doi:10.1590/S1516-89132004000300014
29. Kao L., Motoyama N, Dauterman WC. Studies on Hydrolases in various house fly strains and their role in Malathion resistance. Pestic Biochem Physiol. 1984; 92: 86–92.

Figure 1: Percentage of fat amount in *D. nesus* individuals exposed to distinct veterinary pharmaceutical (Control, Neem and Ivermectin). Letters above block refer to groups of means based on GLM. Blocks that do not have similar letters have significantly different means.

Figure 1.



Conclusões Gerais

Atualmente as avaliações mundiais para acessar os riscos ambientais causados pelos medicamentos veterinários, levam em consideração a frequência e a dose que a substância tóxica é encontrada no solo, dando início a estudos sobre os efeitos dos resíduos sobre a fauna não alvo. Estes testes são realizados com populações em laboratório e também protocolos em campo com a comunidade afetada. Porém, nas avaliações de campo não são levadas em consideração o sistema de pastagem em que o gado é inserido, subestimando os padrões que são observados quanto as consequências dos medicamentos veterinários para os besouros rola-bosta. Portanto, para que os estudos futuros estejam mais próximos da realidade do manejo do gado, objetivando realizar uma avaliação ambiental utilizando rola-bostas como indicadores, devem ser amostrados todos os sistemas de pastagem adotados pelos produtores na região de estudo.

O tipo de pastagem adotado pelos produtores de bovinos no Brasil, influencia grandemente a fauna de rola-bostas presente no agroecossistema. O pacote tecnológico mais utilizado no manejo das pastagens no Brasil, conhecido como “sistema braquiário” onde são formadas pastagens com espécies do gênero *Braquiaria* (*Braquiaria*=*Urochloa*), tem proporcionado aos produtores aumentar a densidade de bovinos por hectare. Sendo que este tipo de manejo suporta 1,2 unidade de animal de 450 kg por hectare, se adotadas as recomendações básicas de manejo de pastejo e realizada periodicamente a avaliação do solo e reposição de nutrientes (VEIGA et al., 2004). Estas pastagens cada vez mais encontradas no território brasileiro, apresentam uma comunidade de rola-bosta dominada por poucas espécies (LOUZADA e CARVALHO-SILVA, 2009; ALMEIDA et al., 2011). Apesar de tornar o ambiente menos diverso em rola-bostas, o sistema de pastagem com Braquiária apresenta maiores taxas de enterrio de fezes e revolvimento de solo realizadas

pela comunidade, comparada a pastagens nativas do Cerrado. Este resultado indica que perda da diversidade não necessariamente significa a perda das funções ecológicas, ao contrário, quando comparando os dois tipos de pastagem, a taxa de funções ecológicas é menor nas áreas nativas. Contudo sabemos que a perda da biodiversidade pode acarretar sérios problemas na manutenção do agroecossistema a longo prazo, portanto conscientizar os produtores da importância de manter áreas nativas de Cerrado em sua propriedade como forma de elevar a biodiversidade de rola-bostas deve ser uma informação a ser disseminada.

Segundo os resultados obtidos nesta dissertação eu concluo que o uso do Nim como medicamento veterinário comparativamente a Ivermectina apresenta melhores resultados quanto a manutenção das funções ecológicas realizadas pelos besouros rola-bostas. A vantagem da utilização do Nim são as maiores taxas de enterrio de fezes e revolvimento de solo realizadas pela comunidade de besouros neste tratamento. Isto indica que o produtor além do controle de pragas no gado incrementa as funções ecológicas que mantem a qualidade das pastagens. Contudo, para que o Nim seja eficiente é preciso criar políticas públicas que incentivem o seu uso considerando seu modo de ação. O modo de ação do Nim é dose dependente e comparado a Ivermectina não tem um efeito imediato no controle das pragas, o que pode decepcionar os produtores acostumados com uma resposta rápida do medicamento veterinário. Ações para a conscientização dos produtores sobre os benefícios da utilização do Nim, como criação e distribuição de cartilhas informativas de como o Nim pode ser empregado no manejo bovino, além da distribuição de mudas da planta aos produtores, podem ser utilizadas como estratégias para a disseminação do uso do Nim.

A Ivermectina provoca alterações na fisiologia de rola-bostas, e apresenta alta preferência alimentar pelos besouros em pastagens introduzidas.

Estudos futuros sobre como o aumento da quantidade de gordura corpórea de *D. nesus* pode influenciar a nível de reprodução e desenvolvimento devem ser encorajados.

A conscientização dos produtores da importância dos rola-bostas nas pastagens e os efeitos letais e sub-letais da Ivermectina nesse grupo de insetos podem auxiliar na transição das técnicas de manejo bovino para uma opção mais ecologicamente sustentável, como o Nim, e assim garantir a continuidade dos processos ecológicos nas pastagens e a manutenção de sua diversidade. Além disso, para incentivar o uso de um medicamento veterinário natural como Nim é possível a criação de certificações para as propriedades que utilizam dessa planta, combinado com reservas de áreas nativas de Cerrado para a conservação da biodiversidade, proporcionando atingir mercados exigentes em qualidade da carne. Adotar técnicas de alta produtividade para a produção de bovinos no Brasil aliada com técnicas de manutenção da biodiversidade melhora a qualidade de toda a cadeia produtiva bovina.

Referências:

- Almeida, S., Louzada, J., Sperber, C., & Barlow, J. Subtle Land-Use Change and Tropical Biodiversity: Dung Beetle Communities in Cerrado Grasslands and Exotic Pastures. **Biotropica**, 43(6), 704-710, 2011.
- Louzada, J. N., & Carvalho E Silva, P. R. Utilisation of introduced Brazilian pastures ecosystems by native dung beetles: diversity patterns and resource use. **Insect Conservation and Diversity**, 2(1), 45-52, 2009.
- Veiga, J. B., Tourrand, J. F., Piketty, M. G., Pocard-Chapuis R., Alves, A. M., Thales, M. C. Expansão e trajetórias da pecuária na Amazônia : Pará, Brasil. Brasília, Editora: UnB, 161p, 2004..