

Importância e aplicações dos ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas

2

Cristina Lúcia Silveira Sisinno
Julia Carina Niemeyer
Julia Corá Segat
Luís Carlos Luñes Oliveira Filho
Cintia Carla Niva
George Gardner Brown

2.1 Introdução

Apesar do crescente reconhecimento da aplicação dos ensaios ecotoxicológicos como instrumentos de avaliação e controle da contaminação da água no Brasil, a utilização desses ensaios para avaliação da contaminação do solo ainda é pouco demandada. Entretanto, os ensaios ecotoxicológicos com organismos vivos podem fornecer informações mais precisas e realísticas sobre os efeitos das variáveis ambientais que são capazes de afetar a toxicidade das substâncias aos componentes vivos de um ecossistema. Desse modo, apenas por meio desses ensaios pode-se indicar uma resposta mais precisa da toxicidade dos contaminantes presentes no ambiente e biodisponíveis para os organismos vivos.

Os ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas (mortalidade, reprodução, comportamento de fuga e bioacumulação) têm sido utilizados no Brasil principalmente no setor acadêmico, mas também podem ter aplicações, por exemplo, no setor regulatório de registro de substâncias a serem comercializadas e no setor de licenciamento de atividades com potencial de contaminação para avaliação da qualidade do solo. Além disso, a aplicação dos ensaios ecotoxicológicos com organismos terrestres como ferramenta de avaliação e controle, ainda não é realizada com a mesma frequência com que são requisitados os ensaios com organismos aquáticos, basicamente, por falta de demanda legal e pouco conhecimento, inclusive, dos técnicos dos órgãos ambientais sobre os dados produzidos e sua interpretação.

Os oligoquetas são organismos pertencentes ao Filo Annelida, Sub-classe Oligochaeta. Habitam ambientes terrestres, aquáticos e até marinhos e se caracterizam pelo corpo vermiforme, segmentado e com poucas cerdas. São hermafroditas e a maioria se reproduz por anfimixia ou partenogênese ou autofertilização, produzindo casulos. Menos comuns são alguns pequenos oligoquetas que podem se reproduzir por arquitomia ou paratomia, fragmentando-se e regenerando-se. Os representantes terrestres mais conhecidos no mundo são, sem dúvida, as minhocas, devido à sua importância na fertilidade do solo e ao seu uso como isca de pesca, e por serem facilmente visualizadas a olho nu. Os

enquitreídeos são pequenos oligoquetas da Família Enchytraeidae, bem menos conhecidos que as minhocas, mas de importância também destacável, sendo comuns em muitos solos do mundo inteiro e mais estudados na Europa e na Ásia. Devido ao seu pequeno tamanho, são visualizados a olho nu com dificuldade. Na Figura 2.1 pode-se observar o contraste de tamanho e pigmentação entre uma minhoca e um enquitreídeo. Existem ainda outros oligoquetas como os gigantes minhocuçus e os pequenos naidídeos e tubificídeos (estes últimos geralmente aquáticos), mas atualmente, as minhocas e enquitreídeos têm sido os mais utilizados no contexto da ecotoxicologia terrestre.

As minhocas são as preferidas como organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos porque são comuns em uma grande variedade de solos, representando 60% a 80% da biomassa total de animais invertebrados do solo (Fragoso et al., 1999). Elas também constituem um importante grupo da fauna edáfica, cujas atividades no solo podem modificar o seu próprio habitat e criar novos para outros organismos, sendo por isso, consideradas engenheiras do ecossistema (Lavelle et al., 1997). Entre suas atividades, destacam-se o transporte de solo e a formação de galerias que favorecem o aumento da porosidade do solo, e a passagem de ar, nutrientes e água. Seus hábitos alimentares de ingestão de solo e de digestão de materiais orgânicos contribuem para a sua trituração e degradação, com consequente disponibilização de nutrientes para as plantas e estímulo da atividade microbiana no solo (Brown, 1995; Edwards; Bohlen, 1996; Lavelle et al., 1997; Römbke et al., 2005, Brown et al., 2015). Além disso, as minhocas possuem quimiorreceptores no prostômio e estruturas sensoriais na superfície do corpo, que lhes conferem alta sensibilidade a substâncias químicas presentes no solo (Reinecke et al., 2002; Zirbes et al., 2011).



Foto: Cintia Carla Niva

Figura 2.1. A minhoca “louca” *Amyntas gracilis* (Kinberg, 1867) (animal maior) e o enquitreídeo *Fridericia* sp. (animal menor), ambos coletados em Santa Catarina e fixados em formol. *Fridericia* sp. é um enquitreídeo relativamente grande e de fácil visualização mesmo a olho nu (a extremidade anterior dos espécimes encontra-se na porção superior da figura).

Os enquitreídeos (Figura 2.2) são organismos da mesofauna saprófaga do solo, pois contribuem para a segregação e decomposição da matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes. Eles influenciam a estrutura do solo, mas em menor escala que as minhocas, devido ao seu tamanho corporal reduzido (de poucos milímetros a quatro centímetros de comprimento) em comparação com as minhocas (Jänsch et al., 2005a, 2005b; Niva et al., 2010a). São sensíveis a substâncias químicas e alterações no ambiente (Jänsch et al., 2005a, 2005b), podem ser abundantes em solos onde as minhocas são escassas, e em outros casos também podem atingir altas densidades populacionais em solos habitados por minhocas (Silva et al., 2006; Beylich; Graefe, 2012). Do ponto de vista prático, apenas algumas espécies do gênero *Enchytraeus* foram cultivadas em laboratório até hoje, todas elas apresentando ciclo de vida significativamente mais curto que o da minhoca, o que reduz o tempo de duração dos ensaios (por exemplo, 28 dias versus 56 dias) (ISO, 1998; Meyer et al., 2002; ABNT, 2012). O ensaio com enquitreídeos também gera menos resíduo devido à quantidade reduzida de substrato utilizado (por exemplo, 20 g de substrato por replicata para enquitreídeos versus 500 g ou mais para a minhoca). Por outro lado, devido ao tamanho corporal pequeno, exigem um pouco mais de habilidade e cuidado no seu manuseio.

Os estudos sobre oligoquetas como indicadores ecotoxicológicos ganharam impulso com o surgimento da norma da Organisation for Economic Co-Operation and Development (OECD) (1984) para o ensaio de mortalidade com a minhoca da espécie *Eisenia fetida* em 1984. Desde então, várias revisões sobre o assunto foram publicadas, dentre as quais, Spurgeon et al. (2003) descrevem em detalhes a história da evolução do ensaio ecotoxicológico com minhocas, desde sua origem. Andréa (2010) discute sobre o uso

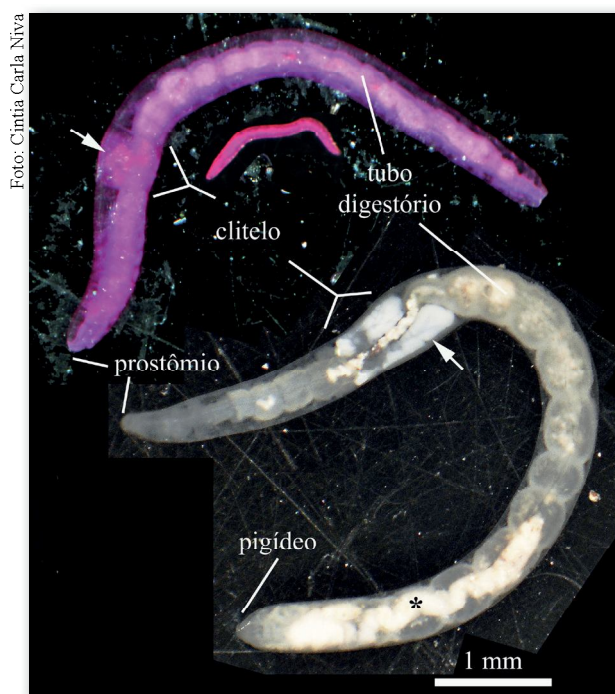


Figura 2.2. *Enchytraeus crypticus* adulto e juvenil fixados e corados com Rosa de Bengala (plano superior) e in vivo (plano inferior). Os espécimes foram fotografados sobre uma lâmina e cobertos por uma laminula para facilitar a visualização dos órgãos internos. Setas indicam oócitos e asterisco indica conteúdo intestinal.

de minhocas como bioindicadoras da contaminação do solo em estudos de laboratório e campo, chamando a atenção para a bioacumulação e uso de biomarcadores. Didden e Römbke (2001) descrevem a importância dos enquitreídeos como indicadores de estresse químico em ecossistemas terrestres e todos os tipos de contaminantes até então estudados com esses organismos. Römbke et al. (2005) e Jänsch et al. (2005b) apresentam as vantagens da utilização das minhocas e enquitreídeos como indicadores da influência antrópica sobre o solo. Alves e Cardoso (2016) também discutem as vantagens e desvantagens e adaptações tropicais em ensaios ecotoxicológicos com diversos invertebrados, incluindo as oligoquetas. Em um livro, Cesar et al. (2014) apresentam e discutem métodos e estudos de caso na ecotoxicologia de solos em relação à contaminação por metais na região tropical com um olhar geoquímico ambiental.

O ensaio de letalidade ou ecotoxicidade aguda com minhocas das espécies *E. fetida* ou *E. andrei* tem sido o mais utilizado no mundo inteiro em avaliações ecotoxicológicas por ter sido o primeiro ensaio a ser padronizado internacionalmente, e também devido à sua relativa simplicidade (Spurgeon et al., 2003; Jänsch et al., 2005a; Andréa, 2010). Foi idealizado para ser conduzido em laboratório primeiramente em papel de filtro como *screening* da dose letal e depois com solo tratado (OECD, 1984). Alguns exemplos incluem a avaliação dos efeitos de agrotóxicos, como fungicidas (Anton et al., 1990; Römbke et al., 2007), herbicidas (Stojanović et al., 2007; Domínguez et al., 2016), inseticidas (Kula; Larink, 1997; Kolar et al., 2008; Gomez-Eyles et al., 2009), além de metais (Lock; Janssen, 2001; Langdon et al., 2005; Alves et al., 2015a) e outros poluentes ambientais (Vampré et al., 2010; Alves et al., 2015b; Cesar et al., 2015; Segat et al., 2015).

A mortalidade é, sem dúvida, um parâmetro fundamental na determinação da ecotoxicidade de uma substância química, mas algumas dessas substâncias podem não causar esse efeito em curto prazo. Concentrações subletais podem comprometer a saúde da biota exposta por períodos de tempo mais longos, podendo assim acumular a substância química em seu corpo, transferindo o contaminante para os organismos ao longo da cadeia trófica (Andréa, 2010). Desse modo, verifica-se que, para determinação da toxicidade potencial de uma substância química, também é importante a utilização de ensaios que avaliem parâmetros que expressem o efeito de níveis subletais da substância em questão, como por exemplo, os ensaios de reprodução e de fuga. Além disso, a toxicidade de uma substância química depende também da sua biodisponibilidade que, por sua vez, pode ser influenciada pelas propriedades do substrato na natureza, ou substrato-teste nos ensaios (ver seção 1.4). A presença da mistura de diferentes substâncias no solo, o que normalmente ocorre em solos antropizados, também é outro fator que pode influenciar a toxicidade sobre as oligoquetas e outros organismos e dificultar a interpretação dos resultados no caso de estudos com matrizes coletadas de regiões contaminadas. Nesse caso, métodos de semi-campo ou campo descritos no capítulo 17 são os mais indicados.

2.2 Ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas no Brasil

Mundialmente, os ensaios ecotoxicológicos com minhocas usam as espécies padrão *E. andrei* ou *E. fetida*. Essas espécies não são encontradas em solos tropicais agrícolas, nem sobrevivem longo tempo neles, necessitando de matéria orgânica fresca para sobreviverem. Assim como ocorreu em outros países, no Brasil essas espécies foram adotadas como padrão, apesar de não serem representativas da fauna edáfica tropical, e serem encontradas quase exclusivamente em atividades de vermicompostagem (Brown et al., 2006; Sisino et al., 2006; Andréa, 2010).

A utilização de espécies mais representativas de solos brasileiros ou de regiões tropicais e subtropicais ainda é matéria de estudos, mas poderá contribuir na geração de resultados mais realistas do impacto de contaminantes no ambiente edáfico. As espécies ideais seriam as nativas de clima tropical ou subtropical, preferencialmente aquelas com ampla distribuição nos solos brasileiros, que ingerem grande quantidade de solo, que estejam presentes nos ambientes onde os contaminantes são ou foram utilizados, e que possam ser criadas e mantidas sob cultivo (especialmente em laboratório), ou coletadas facilmente no campo (ver capítulos 4, 5 e 6).

Buch et al. (2011, 2013) descrevem a falta e a necessidade de estudos com espécies nativas do Brasil e Brown e Domínguez (2010) destacam que um dos grandes desafios para o desenvolvimento dos ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas ainda é a falta de conhecimento sobre a biologia e a ecologia das espécies nativas da América Latina. Talvez por isso, existam poucos dados de ensaios ecotoxicológicos realizados com outras espécies de minhocas de clima tropical e subtropical (Buch, 2013).

Entre as espécies usadas até o momento e que podem ser encontradas no Brasil estão: *Amyntas gracilis*, *Metaphire californica* (Kinberg, 1867), *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857), *Perionyx excavatus* (Perrier, 1872), *Eudrilus eugeniae* (Kinberg, 1867), e *Dichogaster annae* (Horst, 1881) (Brown; James, 2007). Contudo, considerando-se a presença e a facilidade de obtenção no país, pode-se recomendar apenas as espécies *A. gracilis*, *P. excavatus*, *E. eugeniae* e *P. corethrurus* (ver seções 4.2 a 4.5). As duas primeiras são de origem asiática e a terceira de origem africana, sendo todas, portanto, exóticas no Brasil. A última espécie, apesar de ser originária da região adjacente às Guianas (Righi, 1984), no Brasil em regiões fora da Amazônia, deve ser considerada peregrina e exótica. *A. gracilis* e *P. corethrurus* são comumente encontradas no país em ecossistemas perturbados (agrícolas, urbanos e florestais) (Brown et al., 2006), e podem ser criadas e mantidas em cativeiro (Buch et al., 2011; Chang, 1997; James; Guimarães, 2010; Pashanasi, 2007; ver seções 4.4 e 4.5). Além disso, são espécies geófagas, que ingerem solo durante sua alimentação, ficando, assim, mais expostas à contaminação do solo; o que pode representar a possibilidade de contaminação de toda a cadeia

trófica por meio desses organismos que se alimentam do substrato contaminado. Por outro lado, *P. excavatus* e *E. eugeniae* possuem hábito epigêico, similar às espécies adotadas como padrão internacional, e podem ser criadas em cativeiro e disponibilizadas em quantidades necessárias para ensaios ecotoxicológicos (ver seções 4.2 e 4.3). Elas são frequentemente encontradas em minhocários comerciais no país.

As normas OECD 220 (OECD, 2004b), OECD 317 (OECD, 2010) e NBR/ISO 16387 (ABNT, 2012), recomendam a espécie *Enchytraeus albidus* como organismo-teste para os ensaios de letalidade, reprodução e bioacumulação com enquitreídeos. A ocorrência dessa espécie na América do Sul só foi registrada até hoje em habitats litorâneos perto da Antártida. Entretanto, essa espécie tem sido a mais utilizada por ser amplamente distribuída no mundo e ocorrer em vários habitats, ser de fácil manuseio devido ao tamanho maior (pode chegar a 4 cm), ter sensibilidade comprovada a vários tipos de contaminantes em solo artificial e natural, e também porque o ensaio de reprodução com essa espécie foi validado após um trabalho interlaboratorial internacional (Römbke; Moser, 2002; ver seção 1.6.1). No entanto, devido ao ciclo de vida mais curto (*E. crypticus* 30 dias e *E. albidus* 56 dias) e capacidade reprodutiva maior (Westheide; Graefe, 1992; ABNT, 2012), a utilização de *E. crypticus* em ensaios ecotoxicológicos de laboratório tem aumentado significativamente (Posthuma et al., 1997; Achazi et al., 1999; Kuperman et al., 2004; Chelinho et al., 2011, Castro-Ferreira et al., 2012 entre outros). Porém, um dos aspectos negativos de *E. crypticus* é o fato de sua ocorrência no campo não ser conhecida e, portanto, suas exigências ecológicas (Römbke, 2003). Outras espécies com potencial de sensibilidade e que têm sido utilizadas em ensaios ecotoxicológicos são *Enchytraeus luxuriosus* Schmelz & Collado, 1999 (Bruns et al., 2001; Amorim et al., 2005; Kuperman et al., 2006), *Enchytraeus buchholzi* Vejdovski, 1879 (Willuhn et al., 1996) e *E. coronatus* Nielsen & Christensen, 1959 (Arrate et al., 2002).

No Brasil e em toda a América do Sul a inexistência de registros de ocorrência de *E. albidus* ou *E. crypticus* em solo talvez se deva ao fato da diversidade conhecida de enquitreídeos ainda ser restrita a poucas regiões (Römbke, 2007; Schmelz et al., 2013). Algumas espécies do gênero *Enchytraeus*, gênero recomendado pela norma NBR/ISO 16387 (ABNT, 2012) foram encontradas no Brasil e têm sido criadas em laboratório (Niva et al., 2010c). Aspectos da biologia e adequabilidade dessas espécies a ensaios ecotoxicológicos ainda estão sendo estudados (Niva et al., 2010b). Até o momento, considerando-se a tolerância térmica (Dirven-Van Breemen et al., 1994), *E. crypticus* parece ser a espécie mais indicada para ensaios na região tropical e subtropical (ver seção 4.6), já que ela tem melhor desempenho sob temperaturas mais altas (25 °C a 30 °C) quando comparada a *E. albidus* (15 °C a 20 °C). Além disso, estudos com *E. crypticus* demonstraram desempenho reprodutivo melhor do que o de *E. albidus* em solos mais secos (35% - 55% versus 55% - 65% de umidade) (Dirven-Van Breemen et al., 1994). *E. crypticus* também tem maior tolerância à acidez, sobrevivendo em condições de pH de 4 a 8,2 e *E. albidus* tem uma faixa menor, isto é, pH > 5 a 7,4 (Dirven-Van Breemen et al., 1994;

Kuperman et al., 2006; Amorim et al., 2005). *E. crypticus* também se mostrou mais tolerante do que *E. albidus* em relação ao teor de argila (respectivamente, 1% - 49% versus 6% - 26%) e ao teor de matéria orgânica (0,6% - 42% versus 2,5% - 8%) (Amorim et al., 2005; Kuperman et al., 2006; Chelinho et al., 2011).

O primeiro artigo publicado com dados de ensaios ecotoxicológicos com minhocas no Brasil foi de um grupo da Unesp Jaboticabal em 1996 (Ichinose et al., 1996). Em 1999, o Instituto Biológico (SP) iniciou estudos sobre bioacumulação de diferentes agrotóxicos pelas minhocas *E. fetida* e *E. andrei* (Papini; Andréa, 2001; Andréa et al., 2004; Andréa; Papini, 2005) e outros tipos de ensaios, sempre com agrotóxicos (Ferreira et al., 2015). Em seguida, uma nova abordagem na aplicação dos ensaios com minhocas foi dada nos estudos realizados por Sisino et al. (2006, 2007), onde ensaios com *E. fetida* ou *E. andrei* foram usados para avaliar a toxicidade de solos contaminados por hidrocarbonetos e tratados após biorremediação. Recentemente, estudos para avaliar o risco ambiental do uso de lodo de esgoto e resíduos de dragagem (Cesar et al., 2008a, 2008b, 2012), dejetos de animais (Segat et al., 2015) e vinhaça (Alves et al., 2015a) tem evidenciado a preocupação com a qualidade ambiental no aproveitamento de passivos para fins agroflorestais.

A partir do ano 2000, vários estudos pioneiros em ecotoxicologia terrestre na região tropical foram desenvolvidos no Norte do Brasil, na Embrapa Amazônia Ocidental com a colaboração de especialistas alemães (Garcia, 2004; Garcia et al., 2008). Dentre os resultados obtidos nos estudos com agrotóxicos, a adaptação do solo artificial tropical (SAT) para as condições tropicais com o uso de pó da fibra da casca de coco em substituição à turfa de esfagno (Garcia, 2004, ver capítulo 7) nos ensaios com minhocas constituiu um marco na ecotoxicologia terrestre no Brasil. Além disso, os estudos conduzidos por Garcia (2004) e Garcia et al. (2008) comparando diferentes substratos, temperaturas e agrotóxicos demonstraram a necessidade de se utilizar temperaturas mais altas (28 °C) em ensaios voltados para os trópicos, além do uso de espécies nativas. Um estudo conduzido por De Silva et al. (2009) na Holanda comparou o efeito de três agrotóxicos através de ensaios ecotoxicológicos com *E. andrei* em temperatura de clima temperado (20 °C) e tropical (26 °C). Os resultados desse estudo, assim como os obtidos por Garcia et al. (2008), reforçam a necessidade de cuidado ao extrapolar dados gerados em condições de clima temperado para o clima tropical.

Com o aumento do interesse pela preservação da qualidade do solo, vários grupos em universidades (Esalq/USP, EESC/USP, UFSC, Udesc, UFPR, UFRJ, UFF, UFRJ, UP e outras) e instituições de pesquisa (Embrapa, Cetem, Instituto Biológico e outros) têm estabelecido estudos na área de ecotoxicologia terrestre utilizando minhocas, a maioria a partir de meados da primeira década do século 21. Alguns desses grupos ainda contam com significativa colaboração de especialistas da Universidade de Coimbra (Portugal) e da empresa ECT Oekotoxologie GmbH (Alemanha).

O número de trabalhos acadêmicos com oligoquetas (em conjunto, ou não, com outros organismos) tem crescido e esses estudos têm sido utilizados em diferentes aplicações e na avaliação do efeito de diversos tipos de contaminantes no solo, como mostram as características de alguns trabalhos publicados (dissertações, teses e artigos científicos), descritos na Tabela 2.1.

Com base nisso, pode-se destacar que os principais organismos-teste utilizados foram minhocas do gênero *Eisenia* sp. Os agrotóxicos são os contaminantes mais avaliados em estudos de caráter prospectivo, seguidos pelos metais e pelos compostos orgânicos, como os hidrocarbonetos de petróleo e o hexaclorobenzeno. Como os problemas oriundos de áreas contaminadas vêm crescendo cada vez mais no Brasil, alguns dos estudos realizados enfocam a utilização dos ensaios com oligoquetas na avaliação de risco ambiental. Além dos ensaios ecotoxicológicos para avaliação da ecotoxicidade aguda, crônica e o comportamento de fuga, o ensaio de bioacumulação também tem sido aplicado para a avaliação de agrotóxicos, metais e lodo de esgoto (Tabela 2.1).

A utilização dos ensaios de comportamento de fuga com minhocas na avaliação da função de habitat de solos tem se popularizado. Estes ensaios são ecologicamente relevantes e de baixo custo, além de fornecerem informações rápidas de caráter retrospectivo para decisões futuras sobre áreas contaminadas (Hund-Rinke et al., 2005; Natal Da Luz et al., 2004; Niemeyer et al., 2010). Essa avaliação retrospectiva de áreas contaminadas tem utilizado os ensaios com oligoquetas em esquemas integrados de avaliação de risco ambiental (Jensen; Mesman, 2006). No estudo realizado por Antunes et al. (2008a, 2008b) o ensaio de comportamento de fuga com *E. andrei* foi usado como ferramenta na avaliação de risco de uma antiga mina de extração de urânio.

Os processos de biorremediação têm sido muito utilizados para o tratamento de solos contaminados por derivados da indústria do petróleo. Apesar da biorremediação constituir-se em um processo que procura restabelecer as características do solo, por meio da remoção de poluentes por atividade biológica de microorganismos e plantas, muitos subprodutos – às vezes até mais tóxicos do que os contaminantes iniciais – podem ser gerados durante a atividade microbológica. Devido a esse fato, a inserção dos ensaios ecotoxicológicos com organismos terrestres após processos de biorremediação de solos impactados com hidrocarbonetos têm sido de grande interesse em trabalhos desenvolvidos em outros países (Salanitro et al., 1997; Dorn; Salanitro, 2000; Dawson et al., 2007; Hubálek et al., 2007).

Os ensaios com oligoquetas também têm sido utilizados para testar o efeito de nanopartículas inorgânicas (Heckman et al., 2011), nanotubos de carbono (Scott-Fordsman et al., 2008), e produtos veterinários farmacêuticos (Römbke et al., 2010; Menezes-Oliveira et al., 2018b). Outros tipos de impacto, como a salinização de solos, também podem ser avaliados por meio destes ensaios, como mostra o estudo de Owojori et al. (2009).

Tabela 2.1. Resumo de alguns trabalhos ecotoxicológicos publicados no Brasil usando oligoquetas.

Organismo-teste	Ensaio (metodologia)	Contaminante	Tipo de solo	Referência
<i>E. fetida</i>	Bioacumulação	Herbicida Simazina	Argissolo	Papini e Andréa (2001)
<i>E. fetida</i> , <i>P. corethrurus</i>	Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008). Letalidade (OECD 207 - OECD, 1984; ISO 11268-1 - ISO, 1993). Reprodução (OECD 222 - OECD, 2004b; ISO 11268-2 - ISO, 1998). Temperatura adaptada para 28 ± 2 °C.	Carbendazim, Lambda-cialotrina	Solo artificial OECD LUFA 2.2. SAT. Solo natural tropical.	Garcia (2004).
<i>E. fetida</i>	Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008). Letalidade (ISO 11268-1, ISO, 1993). Reprodução (ISO 11268-2, ISO, 1998).	Hidrocarbonetos de petróleo	Areno argiloso.	Sisinno et al. (2006).
<i>E. fetida</i>	Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008)	Hidrocarbonetos de petróleo (após tratamento em biorreator)	Argiloso e Areno argiloso.	Sisinno et al. (2007).
<i>E. andrei</i>	Letalidade (ASTM E1676-04; 2004). Bioacumulação (ASTM E1676-04 - ASTM, 2004)	Biodisponibilidade de Hg, Pb, Zn e Cu	Arenoso e com baixo teor de matéria orgânica.	Cesar et al. (2008a), Cesar et al. (2012)
<i>E. andrei</i>	Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008). Bioacumulação (ASTM E1676-04 - ASTM, 2004).	Lodo de Esgoto (Fe, Al, Zn, Cu, Pb, Hg).	Latossolo Vermelho-amarelo. Chernossolo.	Cesar et al. (2008b).
<i>E. fetida</i>	Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008). Temperatura adaptada para 28 ± 2 °C.	Fungicidas: Benomil e Carbendazim. Inseticida: Lambda-Cialotrina.	Solo artificial segundo OECD (10 % matéria orgânica). SAT - 10 % matéria orgânica. LUFA. Argissolo Vermelho (Acrisol).	Garcia et al. (2008)
<i>E. fetida</i>	Bioacumulação (ASTM E167695, ASTM, 1995).	Hg metálico.	-	Hinton e Veiga (2008)
<i>E. fetida</i> , <i>P. corethrurus</i>	Letalidade (OECD 207 - OECD, 1984). Comportamento de fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008).	Oxícloroto de cobre	SAT	Mestrinho (2009)
<i>E. andrei</i>	Letalidade (OECD 207 e ISO 11268-1 - OECD, 1984; ISO, 1993) Reprodução (OECD 222 e ISO 11268-2 - ISO, 1998; OECD, 2004b) Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008)	Fungicidas: Captan; Carboxim+ Tiran Inseticidas: Imidacloprida, Fipronil, Triametoxam	SAT	Alves (2010); Alves et al. (2013)
<i>E. fetida</i>	Reprodução (ISO 11268-1 - ISO, 1993)	Herbicidas: Glifosato, 2,4-D	Argissolo	Correia e Moreira (2010)
<i>E. andrei</i> , <i>P. corethrurus</i>	Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008) Letalidade (ISO 11268-1 - ISO, 1993) Temperatura adaptada para 20 ± 4 °C	Fungicida: Carbendazim Inseticida-nematocida: Carbofurano Herbicida: Glifosato	SAT - 10% matéria orgânica	Buch (2010); Buch et al. (2013)

Continua...

Tabela 2.1. Continuação...

Organismo-teste	Ensaio (metodologia)	Contaminante	Tipo de solo	Referência
<i>E. andrei</i>	Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008) Letalidade (OECD 207; NBR 15537, ISO 11268-1 - OECD, 2007; ABNT, 2007; ISO, 1993); Reprodução (ISO 11268-2; OECD 222 - ISO, 2008; OECD, 2004b)	Avaliação de áreas contaminadas por pesticidas: Alfa-BHC, Heptacloro, oGammaBHC, Aldrin, Metolacoloro, Beta-endosulfan, Clordano, Dieldrin, Endrin, 4,4 DDT, Metoxicloro, Abamectina, Carbofurano Metais pesados: Cu, Cr, Cd, Fe, Al, Pb, Ni, Co, Mn e Zn	Solos naturais e SAT - 10% matéria orgânica	Lima (2010)
<i>E. andrei</i>	Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008) Temperatura adaptada para 25 ± 2 °C	Avaliação de risco em área contaminada com metais pesados: Pb, Cd, Cu, Zn, Cr, Ni, Fe, Co e Mn	Arenosos e argilosos	Niemeyer et al. (2010)
<i>E. andrei</i>	Bioacumulação (Método descrito em Papini & Andréa, 2004) Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008) Letalidade por contato com papel filtro (OECD 207 - OECD, 1984)	Agrotóxico: Cipermetrina	Latossolo Vermelho Distrófico Típico - LV Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico - PV Gleissolo Melânico Aluminico Típico - GM	Sousa (2010); Sousa e Andréa (2011); Ferreira et al. (2015)
<i>E. andrei</i>	Letalidade (ISO 11268-1; NBR 15537 - ISO, 1993; ABNT, 2007). Reprodução (ISO 11268-2 - ISO, 2008). Temperatura adaptada para 25 ± 2 °C	Agrotóxico: Vertimec 18 EC	SAT- 10% matéria orgânica	Nunes (2010), Nunes et al. (2012)
<i>E. andrei</i>	Letalidade por contato com papel de filtro (método descrito na OECD 207- OECD, 1984). Bioacumulação verificada de acordo com Farenhorst & Prorokopowich (2003)	Hexaclorobenzeno	-	Vampré et al. (2010)
<i>E. andrei</i> , <i>A. gracilis</i> , <i>D. amae</i>	Letalidade (ISO 11268-1 - ISO, 1993) Temperatura adaptada para 20 ± 4 °C	Agrotóxico: Carbofurano, Carbendazim	Latossolo Vermelho	Cantelli (2011)
<i>E. andrei</i> , <i>E. crypticus</i>	Reprodução (ISO 11268-2 - ISO, 2008; ISO 16387 - ISO, 2004) Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008)	Resíduo pirítico, Avaliação de risco	Argissolo e Cambissolo	Oliveira-Filho (2013); Oliveira-Filho et al. (2017)
<i>E. andrei</i> , <i>E. crypticus</i>	Letalidade e reprodução (ISO 11268-2 - ISO, 2008; ISO 16387 - ISO, 2004) Comportamento de fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008)	Avaliação de risco: sedimento de dragagem, lodo de esgoto	Latossolo e Chernossolo	Cesar (2014); Cesar et al. (2015, 2016)
<i>E. andrei</i> , <i>E. crypticus</i>	Letalidade (ISO 11268-1 - ISO, 1993) Reprodução (ISO 11268-2 - ISO, 2008; ISO 16387 - ISO, 2004) Modelo de Ecossistemas Terrestres (TME) com comunidades naturais	Dejeto suíno	Argissolo vermelho eutroférico Latossolo vermelho distrófico Neossolo quartzarênico	Segat (2012, 2016); Segat et al. (2015)

Continua...

Tabela 2.1. Continuação...

Organismo-teste	Ensaio (metodologia)	Contaminante	Tipo de solo	Referência
<i>E. andrei</i> , <i>E. crypticus</i>	Letalidade (ISO 11268-1 - ISO, 1993) Reprodução (ISO 11268-2 - ISO, 2008; ISO 16387 - ISO, 2004)	Lama vermelha (resíduo do refino da bauxita)	SAT - 5% matéria orgânica; solo natural	Bianchi (2013)
<i>Enchytraeus</i> sp. (espécie autóctone)	Reprodução (NBR ISO 16387 - ABNT, 2012) Temperatura adaptada para 22 ± 4 °C, 21 dias	Ácido bórico; Roundup WG®, solo agrícola	SAT - 5% matéria orgânica; solo natural com histórico agrícola	Assis (2015)
<i>E. andrei</i> , <i>E. crypticus</i>	Reprodução (ISO 11268-2 - ISO, 2008; ISO 16387 - ISO, 2004) Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008)	Vinhaça	Latossolo vermelho, latossolo vermelho amarelo, SAT - 10%	Alves (2015); Alves et al. (2015a)
<i>E. andrei</i>	Letalidade (ISO 11268-1 - ISO, 2012) Reprodução (ISO 11268-2 - ISO, 2012)	Ácido aminometilfosfônico (AMPA)	SAT - 10% matéria orgânica	Dominguez et al. (2016)
<i>E. andrei</i> , <i>P. corethrurus</i>	Comportamento de fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008) Letalidade (ISO 11268-1 - ISO, 2012) Reprodução (ISO 11268-2 - ISO, 2012; mas aumentada para 91 dias) Bioacumulação (OECD, 2010)	Mercurio-Hg	SAT - 10% matéria orgânica e solo natural	Buch et al. (2017)
<i>E. crypticus</i>	Reprodução (NBR ISO 16387 - ABNT, 2012)	Solo com derramamento de óleo	Solo natural com histórico de contaminação	Scoriza et al. (2018)
<i>E. crypticus</i>	Letalidade e reprodução (OECD 220 - OECD, 2004)	Agrotóxicos: KRAFT 36 EC, SCORE	Solo agrícola	Menezes-Oliveira et al. (2018a)
<i>E. andrei</i> , <i>E. crypticus</i>	Letalidade (ISO 11268-1 - ISO, 2012) Reprodução (ISO 11268-2 - ISO, 2012; NBR ISO 16387 - ABNT, 2012)	Ácido bórico	SAT - 5% matéria orgânica	Niemeyer et al. (2018a)
<i>E. andrei</i>	Letalidade (ISO 11268-1 - ISO, 2012) Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008)	Agrotóxico: Metsulfuron-metil	SAT - 5% matéria orgânica	De Santo et al. (2018)
<i>E. andrei</i>	Comportamento de Fuga (ISO 17512-1 - ISO, 2008) e modificado para avaliar fuga em presença de aveia contaminada Levantamento de minhocas em campo em área com e sem aplicação de herbicidas	Agrotóxico: Roundup ® Original; Trop®; Zapp® Qi 620; Crucial® em laboratório e em campo	SAT - 5% matéria orgânica; húmus (com e sem aveia contaminada do campo)	Niemeyer et al. (2018b)

Em países de clima temperado, estudos de ecotoxicidade com enquitreídeos (ver também capítulo 1) têm sido aplicados tanto para avaliação de substâncias isoladas (Collado et al., 1999), como para misturas presentes em solos artificiais ou naturais (Posthuma et al., 1997) aplicadas em laboratório e também a partir da situação de campo. Peijnenburg et al. (1999) avaliaram a biodisponibilidade de metais para *E. crypticus* enfocando as diferenças existentes entre 20 diferentes tipos de solo do campo, enquanto Droge et al. (2006) avaliaram a ecotoxicidade crônica de hidrocarbonetos sobre a reprodução de oligoquetas. Várias substâncias químicas também foram avaliadas por meio do ensaio de comportamento de fuga com *E. albidus*, porém essa espécie demonstrou limitações quanto ao uso desse tipo de ensaio (Amorim et al., 2008). Römbke et al. (2017) faz uma interessante revisão sobre o uso de enquitreídeos em ensaios de laboratório e campo em relação aos efeitos de agrotóxicos.

Os enquitreídeos também têm sido utilizados em avaliações da abundância e diversidade como parâmetros da contaminação em campo (Didden; Römbke, 2001; Römbke et al., 2002). Há um grande potencial de aplicabilidade dos enquitreídeos para estudos de toxicidade de uma grande variedade de substâncias, desde agrotóxicos, metais pesados, fertilizantes, resíduos industriais e domésticos (Didden; Römbke, 2001). No Brasil, o número de estudos é crescente, em geral em conjunto com outros organismos na avaliação de substâncias em solo natural ou artificial ou na avaliação de solos já contaminados (Scoriza et al., 2015; Oliveira Filho et al., 2015; Alves, 2015a; Buch et al., 2017; Menezes-Oliveira et al., 2018b e outros) (Tabela 2.1). Existem estudos da biologia de espécies nativas da região subtropical (Niva et al., 2010b; 2010c) e uma espécie autóctone *Enchytraeus* sp. tem sido utilizada em ensaios (Assis, 2015; Oliveira-Filho et al., 2017). Espécies fragmentadoras como *E. dudichi*, que ocorrem em solo brasileiro, também tem sido utilizadas em estudos mais recentes (Niva et al., 2012; Dalla Rosa et al., 2017).

2.3 Aplicação de ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas para fins normativos e legais

2.3.1 Registro de agrotóxicos

Com base em uma Lei Federal nº 7.802 e a Portaria nº 84 (Brasil, 1989, 1996), ensaios de toxicidade com vários tipos de organismos não alvo são solicitados para a avaliação do potencial de periculosidade ambiental (PPA) de agrotóxicos, seus componentes e afins (ver capítulo 3). São solicitados ensaios de toxicidade com organismos não alvo que, combinados aos resultados de bioconcentração, persistência e comportamento da substância em questão, servem de base para o cálculo do PPA, utilizado para a classificação do agrotóxico. Os ensaios com organismos de solo normalmente solicitados para atendimento a essa demanda legal tem sido o de microorganismos e de ecotoxicidade aguda

com minhocas (*E. fetida* ou *E. andrei*). Mas como já discutido anteriormente (seção 1.2.1), o ensaio de ecotoxicidade aguda para fins de registro de produtos caiu em desuso na Europa, sendo o ensaio de reprodução de minhocas (e ensaios com outros organismos do solo) mais aceito atualmente.

2.3.2 Classificação de resíduos sólidos

Apesar da NBR 10.004 – Resíduos Sólidos – Classificação, indicar que para a avaliação da toxicidade de um resíduo sólido deve-se considerar os efeitos nocivos da presença de agentes ecotóxicos e os efeitos associados a cada substância química ou decorrente do sinergismo entre as substâncias constituintes do resíduo (ABNT, 2004), a realização de ensaios ecotoxicológicos para complementar a classificação de resíduos perigosos ainda é pouco demandada no Brasil.

Estima-se que um dos maiores entraves para a solicitação desse tipo de ensaio pelos técnicos dos órgãos ambientais seja o pouco conhecimento sobre o assunto e a dificuldade de orientação na solicitação do ensaio decorrente, muitas vezes, da própria dificuldade de interpretação dos resultados produzidos, uma vez que muitos técnicos não possuem capacitação em ecotoxicologia. Um trabalho interlaboratorial produzido na Europa demonstrou a necessidade da utilização de uma bateria de ensaios com diferentes organismos aquáticos e terrestres, entre eles, o ensaio de fuga com minhocas, para avaliar mais seguramente a ecotoxicidade de resíduos sólidos (Moser et al., 2011).

Elutriados de resíduos sólidos podem ser preparados para serem usados em ensaios com organismos aquáticos. Na norma NBR 15469 – Ecotoxicologia – Coleta, preservação e preparo de amostras (ABNT, 2015) pode ser encontrada uma metodologia para preparação do elutriado. No caso de amostras sólidas e semi-sólidas, a escolha do organismo-teste e o procedimento de avaliação precisam ser feitos de forma que as características da amostra não sejam alteradas significativamente, influenciando positivamente ou negativamente no resultado.

2.3.3 Avaliação de risco ambiental em áreas contaminadas

Estudos de avaliação de risco ambiental podem ser realizados em áreas contaminadas com a coleta de amostras para realização de ensaios de ecotoxicidade laboratoriais (p.ex., Römbke et al., 2006a), e em avaliações em campo, com a amostragem de organismos (Römbke et al., 2006b) e/ou ensaios *in situ* (Antunes et al., 2008a, 2008b). Tais estudos são, inclusive, recomendados pela Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama) nº 420, de 28 de dezembro de 2009 (Brasil, 2009) (ver capítulo 3). Entretanto, esses estudos ainda estão em desenvolvimento e têm sido pouco aplicados no Brasil, principalmente por serem de custo elevado e por ainda existirem muitos questionamentos com relação à melhor metodologia a ser aplicada em cada caso.

Os ensaios com oligoquetas para avaliação de áreas contaminadas podem ser utilizados para avaliação da função de habitat dos solos naturais, sendo indicados tanto os ensaios de ecotoxicidade aguda – como, por exemplo, o descrito na NBR 15537 (ABNT, 2014) – e crônica com minhocas *E. fetida* ou *E. andrei* quanto o ensaio de ecotoxicidade crônica com enquitreídeos descrito na NBR ISO 16387 (*Enchytraeus* sp.) (ABNT, 2012). Esses ensaios estão descritos no guia para a seleção e a avaliação de bioensaios para caracterização ecotoxicológica de solos e materiais de solo - ABNT NBR ISO 17616 (ABNT, 2010). Para áreas onde ocorre a deposição de sedimentos de dragagem, Cesar et al. (2015) propuseram um índice de risco ecológico para latossolos e chernossolos, baseado em ensaios com vários organismos. Uma norma para avaliação de risco está em discussão na ABNT e o Ibama tem se esforçado para avançar nas normativas para a avaliação de risco ambiental. O meio acadêmico no Brasil tem gerado trabalhos em nível de pós-graduação que promovem avanços na avaliação de risco com organismos de solo no Brasil, como a Udesc, UFRJ, EESC/USP entre outros, sendo na maioria dos casos em cooperação com a Universidade de Coimbra – Portugal (por exemplo: Niemeyer, 2010; Cesar, 2014; Oliveira-Filho, 2013).

2.4 Desafios para o avanço da ecotoxicologia terrestre no Brasil

Apesar de todos os esforços para aplicação dos ensaios ecotoxicológicos como importante instrumento de avaliação de risco de substâncias químicas para a qualidade do solo e do ambiente, incluindo aqueles de origem biológica, muitos desafios ainda precisam ser superados.

Niemeyer et al. (2017) apontam para lacunas, tanto na avaliação de risco de caráter prospectivo quanto retrospectivo, e propõem ações para o avanço da avaliação de risco ambiental. São necessários estudos sobre o efeito e biodisponibilidade de contaminantes em diferentes tipos de solo representativos do Brasil, bem como sobre a tolerância de diferentes espécies em diferentes cenários. Consideram-se contaminantes os agrotóxicos e seu uso excessivo e as misturas presentes no solo, metais, fármacos, salinização, resíduos industriais ou da agropecuária e do tratamento de esgoto usados como fertilizantes e substâncias de origem biológica utilizados no controle de pragas, entre outros. Também não há ainda uma definição clara dos objetos de proteção por parte dos diferentes interessados, ou seja, deve-se definir o que se quer proteger e onde se quer proteger o que, e, dessa forma, implementar e operacionalizar uma avaliação de risco ambiental sólida e eficiente.

Entre os desafios mais gerais, destaca-se:

1. Maior acessibilidade às normas técnicas – desafio que aos poucos está sendo superado com o auxílio da ABNT/CEE-106 – Comissão de Estudo

Especial de Análises Ecotoxicológicas, por meio da tradução das normas ISO de qualidade do solo e adaptação para as condições brasileiras.

2. Necessidade de formação de recursos humanos e de produção de dados científicos tanto na área aplicada de métodos em ecotoxicologia terrestre, quanto em áreas de pesquisa básica em ecologia e biologia de organismos edáficos, essenciais para o desenvolvimento de métodos mais adequados – desafio que precisa de incentivo técnico e financeiro das agências de fomento e dos centros de pesquisa e universidades.
3. Maior troca de experiência por meio da realização de encontros técnicos, congressos e seminários – desafio que envolve o reconhecimento da importância da área de ecotoxicologia terrestre dentro da comunidade científica.
4. Melhor capacitação dos técnicos dos órgãos ambientais – desafio que necessita do apoio e do reconhecimento dessa necessidade pelos dirigentes dos órgãos ambientais.
5. Elaboração de Resoluções, Diretrizes e outros instrumentos legais onde a aplicação dos ensaios possa ser exigida como ferramenta de controle – desafio que envolve todos os outros citados acima.

A ecotoxicologia terrestre no Brasil tem avançado nos últimos anos. O número de estudantes de pós-graduação e estudos nessa área tem aumentado muito, graças ao esforço de algumas universidades e seus professores/pesquisadores em promover o tema em disciplinas e cursos oferecidos, bem como o apoio da Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia em eventos relacionados ao tema (Niva et al., 2016; Niemeyer et al., 2017).

Referências

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 10.004**: resíduos sólidos: classificação. Rio de Janeiro, 2004.
- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15469**: ecotoxicologia: coleta, preservação e preparo de amostras. Rio de Janeiro, 2015.
- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15537**: ecotoxicologia terrestre: ecotoxicidade aguda: método de ensaio com minhocas. Rio de Janeiro, 2007.
- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR/ISO 16387**: qualidade do solo: efeitos de poluentes em Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência. Rio de Janeiro, 2012.
- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15537**: ecotoxicologia terrestre: ecotoxicidade aguda: método de ensaio com minhocas. Rio de Janeiro, 2014.
- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR/ISO 17616**: qualidade do solo: guia para a seleção e a avaliação de bioensaios para caracterização ecotoxicológica de solos e materiais de solo. Rio de Janeiro, 2010.
- ACHAZI, R. K.; FRÖHLICH, E.; HENNEKEN, M.; PILZ, C. The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992 (Enchytraeidae, Oligochaeta).

- In: SCHMELZ, R.; SÜHLO, K. (Ed.). **Proceedings of the 3rd International Symposium on Enchytraeidae**, Osnabrück, Germany: 3-4 July 1998. Osnabrück: Rasch Druckerei und Verlag GmbH & Co. KG, 1999. p. 117-126.
- ALVES, P. R. L. **Avaliação ecotoxicológica de agrotóxicos em *Eisenia andrei* (Oligochaeta) e *Folsomia candida* (Collembola)**. 2010. 123 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- ALVES, P. R. L.; CARDOSO, E. J. B. N.; MARINES, A. M.; SOUSA, J. P.; PASINI, A. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. **Chemosphere**, v. 90, p. 2674-2682, 2013. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.11.046.
- ALVES, P. R. L.; CARDOSO, E. J. B. N. Overview of the standard methods for soil ecotoxicology testing. In: LARRAMENDY, M. L.; SOLONESKI, S. (Ed.). **Invertebrates: experimental models in toxicity screening**. Rijeka: InTech, 2016. p. 35-56.
- ALVES, P. R. L.; NATAL-DA-LUZ, T.; SOUSA, J. P.; CARDOSO, E. J. B. N. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. **Science and Total Environment**, v. 526, p. 222-232, 2015a. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.03.150.
- ALVES, R. H.; RIETZLER, A. C. Toxic effects of Arsenic on *Eisenia andrei* exposed to soils surrounding gold mining operations. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 682-689, 2015b. DOI: 10.1590/01000683rbcs20140060.
- AMORIM, M. J. B.; NOVAIS, S.; RÖMBKE, J.; SOARES, A. M. V. M. *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): a test organism in a standardized avoidance test? Effects of different chemical substances. **Environment International**, v. 34, p. 363-371, 2008. DOI: 10.1016/j.envint.2007.08.010.
- AMORIM, M. J. B.; RÖMBKE, J.; SCHEFFCZYK, A.; SOARES, A. M. V. M. Effects of different soil types on the enchytraeids *Enchytraeus albidus* and *Enchytraeus luxuriosus* using the herbicide Phenmedipham. **Chemosphere**, v. 61, p. 1102-1114, 2005. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.03.048.
- ANDRÉA, M. M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. **Acta Zoológica Mexicana**, v. 26, p. 95-107, 2010.
- ANDRÉA, M. M.; PAPINI, S. Influence of soil properties on bioaccumulation of 14C-simazine in earthworms *Eisenia fetida*. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 40, p. 55-58, 2005.
- ANDRÉA, M. M.; PAPINI, S.; PERES, T. B.; BAZARIN, S.; SAVOY, V. L. T.; MATALLO, M.B. Glyphosate: influência na bioatividade do solo e ação de minhocas sobre sua dissipação em terra agrícola. **Planta Daninha**, v. 22, p. 95-100, 2004. DOI: 10.1590/S0100-83582004000100012.
- ANTON, F.; LABORDA, E.; LABORDA, P. Acute toxicity of the fungicide captan to the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 82-87, 1990.
- ANTUNES, S. C.; CASTRO, B. B.; NUNES, B.; PEREIRA, R.; GONÇALVES, F. In situ bioassay with *Eisenia andrei* to assess soil toxicity in an abandoned uranium mine. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 620-631, 2008a. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2008.02.007.
- ANTUNES, S. C.; CASTRO, B. B.; PEREIRA, R.; GONÇALVES, F. Contribution for tier I of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): II. Soil ecotoxicological screening. **Science of the Total Environment**, v. 390, p. 387-395, 2008b. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2007.07.053.

ARRATE, J. A.; RODRIGUEZ, P.; MARTINEZ-MADRID, M. Effects of three chemicals on the survival and reproduction of the oligochaete worm *Enchytraeus coronatus* in chronic toxicity tests. **Pedobiologia**, v. 46, p. 136-149, 2002. DOI: 10.1078/0031-4056-00120.

ASSIS, O. **Enquitreídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta) como indicadores do manejo do solo e em ensaios ecotoxicológicos**. 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba.

ASTM. American Society for Testing and Materials. **ASTM E1676-04**: standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the *Enchytraeid potworm* *Enchytraeus albidus*. West Conshohocken, 2004.

ASTM. American Society for Testing and Materials. **ASTM E1676-95**: standard guide for conducting a laboratory soil toxicity test with Lumbricid earthworm *Eisenia foetida*. Philadelphia, 1995.

BEYLICH, A.; GRAEFE, U. Relationships between microannelid and earthworm activity. **Landbauforschung – vTI Agriculture and Forestry Research**, special issue 357, p. 1-12, 2012. (Newsletter on enchytraeidae, 12).

BIANCHI, M. O. **Ensaio ecotoxicológicos como ferramenta para avaliação do impacto ambiental de resíduos de mineração sobre o solo**. 2013. 91 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Portaria Normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996**. Disponível em: <http://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/Portaria_84.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2011.

BRASIL. Presidência da República. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: <www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/17802.htm>. Acesso em: 25 jul. 2011.

BRASIL. **Resolução CONAMA Nº 420, de 28 de dezembro de 2009**. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Disponível em: <www.mma.gov.br/port/conama/index.cfm>. Acesso em: 25 jul. 2011.

BROWN, G. G.; DOMÍNGUEZ, J. Uso das minhocas como bioindicadoras ambientais: princípios e práticas. **Acta Zoológica Mexicana**, v. 26, p. 1-18, 2010.

BROWN, G. G. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? **Plant Soil**, v. 170, p. 209-231, 1995. DOI: 10.1007/BF02183068.

BROWN, G. G.; JAMES, S. W. Ecologia, biodiversidade e biogeografia das minhocas no Brasil. In: BROWN, G. G.; FRAGOSO, C. (Ed.). **Minhocas na América Latina**: biodiversidade e ecologia. Londrina: Embrapa Soja, 2007. p. 297-381.

BROWN, G. G.; JAMES, S. W.; PASINI, A.; NUNES, D. H.; BENTO, N. P.; MARTINS, P. T.; SAUTTER, K. D. Exotic, peregrine, and invasive earthworms in Brazil: diversity, distribution, and effects on soils and plants. **Caribbean Journal of Science**, v. 42, n. 3, p. 339-358, 2006.

BROWN, G. G.; NIVA, C. C.; ZAGATTO, M. R. G.; FERREIRA, S. de A.; NADOLNY, H. S.; CARDOSO, G. B. X.; SANTOS, A.; MARTINEZ, G. de A.; PASINI, A.; BARTZ, M. L. C.; SAUTTER, K. D.; THOMAZINI, M. J.; BARETTA, D.; SILVA, E. da; ANTONIOLLI, Z. I.; DECAËNS, T.; LAVELLE, P. M.; SOUSA, J. P.; CARVALHO, F. Biodiversidade da fauna do solo e sua contribuição para os serviços ambientais. In: PARRON, L. M.; GARCIA, J. R.; OLIVEIRA, E. B. de; BROWN, G. G.; PRADO, R. B. (Ed.). **Serviços ambientais em sistemas agrícolas e florestais do Bioma Mata Atlântica**. Brasília, DF: Embrapa, 2015. p. 121-154.

- BRUNS, E.; EGELER, P.; RÖMBKE, J.; SCHEFFCZYK, A.; SPOERLEIN, P. Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). **Hydrobiologia**, v. 463, p. 185-196, 2001. DOI: 10.1023/A:1013159810067.
- BUCH, A. C.; BROWN, G. G.; CORREIA, M. E. F.; LOURENÇATO, L. F.; SILVA-FILHO, E. V. Ecotoxicology of mercury in tropical forest soils: Impact on earthworms. **Science of the Total Environment**, v. 589, p. 222-231, 2017. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.150.
- BUCH, A. C.; BROWN, G. G.; NIVA, C. C.; SAUTTER, K. D.; LOURENÇATO, L. F. Life cycle of *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) in tropical artificial soil. **Pedobiologia**, v. 54S, p. S19-S25, 2011.
- BUCH, A. C.; BROWN, G. G.; NIVA, C. C.; SAUTTER, K. D.; LOURENÇATO, L. F. Toxicity of three pesticides commonly used in Brazil to *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) and *Eisenia andrei* Bouché, 1972. **Applied Soil Ecology**, v. 69, p. 32-38, 2013. DOI: 10.1016/j.apsoil.2012.12.011.
- BUCH, A. C. ***Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) e *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) como bioindicadoras de solos contaminados por agrotóxicos**. 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- BUCH, A. C.; SCHMELZ, R. M.; NIVA, C. C.; CORREIA, M. E. F.; SILVA-FILHO, E. V. Mercury critical concentrations to *Enchytraeus crypticus* (Annelida: Oligochaeta) under normal and extreme conditions of moisture in tropical soils: reproduction and survival. **Environmental Research**, v. 155, p. 365-372, 2017. DOI: 10.1016/j.envres.2017.03.005.
- CANTELLI, K. B. **Toxicidade aguda de carbofurano e carbendazim a minhocas em solo natural**. 2011. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- CASTRO-FERREIRA, M. P.; ROELOFS, D.; VAN GESTEL, C. A. M.; VERWEIJ, R. A.; SOARES, A. M. V. M.; AMORIM M. J. B. *Enchytraeus crypticus* as model species in soil ecotoxicology. **Chemosphere**, v. 87, p. 1222-1227, 2012. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.01.021.
- CESAR, R. G.; CASTILHOS, Z. C.; RODRIGUES, A. P.; BIDONE, E. D.; EGLER, S. G.; POLIVANOV, H. **(Eco)toxicologia de metais em solos: conceitos, métodos e interface com a geoquímica ambiental**. Rio de Janeiro: CETEM, 2014. 100 p. (Série tecnologia ambiental).
- CESAR, R. G. **Disposição de sedimentos de dragagem em solos tropicais: avaliação de risco ambiental com base em indicadores pedogeocímicos e ecotoxicológicos**. 2014. 223 f. Tese (Doutorado em Geoquímica Ambiental) - Universidade Federal Fluminense, Niterói.
- CESAR, R. G.; EGLER, S. G.; ALAMINO, R. C. J.; POLIVANOV, H.; SILVA, R. C.; CASTILHOS, Z. C.; ARAUJO, P. C. Avaliação do potencial tóxico de latossolos e chernossolos acrescidos de lodo de esgoto utilizando bioensaios com oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 31, p. 53-60, 2008a.
- CESAR, R. G.; EGLER, S. G.; POLIVANOV, H. Biodisponibilidade de metilmercúrio, zinco e cobre em distintas frações granulométricas de solo contaminado utilizando oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 31, p. 33-41, 2008b.
- CESAR, R.; NATAL-DA-LUZ, T.; BIDONE, E.; CASTILHOS, Z.; POLIVANOV, H.; SOUSA, J. P. Disposal of dredged sediments in tropical soils: ecotoxicological evaluation based on bioassays with springtails and enchytraeids. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 22, p. 2916-2924, 2015. DOI: 10.1007/s11356-014-3559-3.
- CESAR, R.; RODRIGUES, A. P.; BIDONE, E.; CASTILHOS, Z.; POLIVANOV, H.; de CAMPOS, T. Proposta de um índice de risco ecológico para disposição sustentável de sedimentos de dragagem em latossolos e chernossolos. **Geociências**, v. 34, n. 2, p. 275-285, 2016.

CESAR, R.; SILVA, M.; COLONESE, J.; BIDONE, E.; EGLER, S.; CASTILHOS, Z.; POLIVANOV, H. Influence of the properties of tropical soils in the toxicity and bioavailability of heavy metals in sewage sludge-amended lands. **Environmental Earth Sciences**, v. 66, p. 2281-2292, 2012. DOI: 10.1007/s12665-011-1449-2.

CHANG, Y. C. Minireview: Natural history of *Amyntas hawayanus* (Rosa, 1891). **Acta Biologica Paranaense**, v. 26, p. 39-50, 1997.

CHELINHO, S.; DOMENE, X.; CAMPANA, P.; NATAL-DA-LUZ, T.; SCHEFFCZYK, A.; RÖMBKE, J.; ANDRÉS, P.; SOUSA, J. P. Improving ecological risk assessment in the mediterranean area: selection of reference soils and evaluating the influence of soil properties on avoidance and reproduction of two oligochaete species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 5, p. 1050-1058, 2011. DOI: 10.1002/etc.480.

COLLADO, R.; SCHMELZ, R. M.; MOSER, T.; RÖMBKE, J. Enchytraeid reproduction test (ERT): different sublethal responses of two *Enchytraeus species* (Oligochaeta) to toxic chemicals. **Pedobiologia**, v. 43, p. 625-629, 1999.

CORREIA, F. V.; MOREIRA, J. C. Effects of Glyphosate and 2,4-D on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 85, p. 264-268, 2010.

DALLA ROSA, V. M.; CARNIEL, L. S. C.; ALEXANDRE, D.; NIVA, C. C.; KLAUBERG FILHO, O. Toxicidade de Bravonil 500® (Clorotalonil) para *Enchytraeus dudichi* e *Eisenia andrei*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL CIÊNCIA, SAÚDE E TERRITÓRIO, 4., 2017, Lages. **Alimentos seguros, nutritivos e suficientes: anais**. Lages: Uniplac, 2017.

DAWSON, J. J. C.; GODSIFFE, E. J.; THOMPSON, I. P.; RALEBITSO-SENIOR, T. K. Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 164-177, 2007. DOI: 10.1016/j.soilbio.2006.06.020.

DE SANTO, F. B.; RAMOS, G. A.; RICARDO-FILHO, A. M.; MARCHIORO, C. A.; NIEMEYER, J. C. Screening effects of metsulfuron-methyl to collembolans and earthworms: the role of adjuvant addition on ecotoxicity. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 24, p. 24143-24149, 2018. DOI: 10.1007/s11356-018-2481-5.

DE SILVA, P. M.; PATHIRATNE, A.; VAN GESTEL, C. A. M. Influence of temperature and soil type on the toxicity of three pesticides to *Eisenia andrei*. **Chemosphere**, v. 76, p. 1410-1415, 2009. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.06.006.

DIDDEN, W.; RÖMBKE, J. Enchytraeids as indicator organisms for chemical stress in terrestrial ecosystems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 50, p. 25-43, 2001. DOI: 10.1006/eesa.2001.2075.

DIRVEN-VAN BREEMEN, E.; BAERSELMANN, R.; NOTENBOOM, J. **Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek**. Nederlands: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne, 1994. 26 p. (RIVM Rapport, 719102025).

DOMÍNGUEZ, A.; BROWN, G. G.; SAUTTER, K. D.; DE OLIVEIRA, C. M. R.; DE VASCONCELOS, E. C.; NIVA, C. C.; BARTZ, M. L. C.; BEDANO, J. C. Toxicity of AMPA to the earthworm *Eisenia andrei* Bouché, 1972 in tropical artificial soil. **Scientific Reports**, v. 6, n. 19731, 2016. DOI: 10.1038/srep19731.

DORN, P. B.; SALANITRO, J. P. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. **Chemosphere**, v. 40, p. 419-426, 2000.

DROGE, S. T. J.; PAUMEN, M. L.; BLEEKER, E. A. J.; KRAAK, M. H. S.; VAN GESTEL, C. A. M. Chronic toxicity of polycyclic aromatic compounds to the springtail *Folsomia candida* and the enchytraeid *Enchytraeus crypticus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9, p. 2423-2431, 2006.

EDWARDS, C. A.; BOHLEN, P. J. **Biology of earthworms**. 3. ed. London: Chapman & Hall, 1996.

FERREIRA, R. C.; PAPINI, S.; DE ANDRÉA, M. M. Bioavailability and influence of ¹⁴C-carbofuran on *Eisenia andrei* avoidance, growth and reproduction in treated natural tropical soils. **Journal of Environmental Science and Health**, Part B, v. 50, n. 4, p. 266-274, 2015. DOI: 10.1080/03601234.2015.999599.

FRAGOSO, C.; LAVALLE, P.; BLANCHART, E.; SENAPATI, B.; JIMÉNEZ, J. J.; MARTÍNEZ, M. A.; DECAËNS, T.; TONDOH, J. Earthworm communities of tropical agroecosystems: origin, structure and influence of management practices. Pp. 27-55. In: LAVALLE, P.; BRUSSAARD, L.; ENDRIX, P. F. (Eds.). **Earthworm management in tropical agroecosystems**. Wallingford: CABI, 1999. p. 27-55.

GARCIA, M. **Effects of pesticides on soil fauna**: Development of ecotoxicological test methods for tropical regions. Göttingen: Cuvillier, 2004. (Ecology and Development Series, 19).

GARCIA, M.; RÖMBKE, J.; BRITO, M. T.; SCHEFFCZYK, A. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. **Environmental Pollution**, v. 153, p. 450-456, 2008. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.08.007.

GOMEZ-EYLES, J. L.; SVENDSEN, C.; LISTER, L.; MARTIN, H.; HODSON, M. E.; SPURGEON, D. J. Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 1, p. 71-79, 2009. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2008.07.006.

HECKMAN, L.; SUTHERLAND, D. S.; BESENBACHER, F.; HOVGAARD, M. B.; AUTRUP, H.; SCOTT-FORDSMAN, J. J. Limit-test toxicity screening of selected inorganic nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology**, v. 20, p. 226-233, 2011. DOI: 10.1007/s10646-010-0574-0.

HINTON, J. J.; VEIGA, M. M. The influence of organic acids on mercury bioavailability: insight from an earthworm assessment protocol. **Environmental Bioindicators**, v. 3, p. 47-67, 2008. DOI: 10.1080/15555270801973559.

HUBÁLEK, T.; VOSÁHLOVÁ, S.; MATEJU, V.; KOVÁCOVÁ, N.; NOVOTNÝ, C. Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil during bioremediation: a case study. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 1-7, 2007. DOI: 10.1065/jss2005.06.142.

HUND-RINKE, K.; LINDEMANN, M.; SIMON, M. Experiences with novel approaches in earthworm testing alternatives. **Journal of Soils & Sediments**, v. 5, p. 233-239, 2005.

ICHINOSE, A. M.; MACHADO NETO, J. G.; ZAGATTO, P. A. Acute toxicity for earthworms (*Eisenia foetida*) in agricultural soils, sand, and artsol substrate, in laboratory conditions. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 9, p. 21-26, 1996.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 11268-1**: soil quality: effects of pollutants on earthworms: part 1: determination of acute toxicity using artificial soil substrate. Genebra, 1993.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 11268-2**: soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*): part 2: determination of effects on reproduction. Genebra, 1998.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 17512-1**: soil quality: avoidance test for evaluating the quality of soils and the toxicity of chemicals: part 1: test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). Genebra, 2008.

- JAMES, S. W.; GUIMARÃES, A. A. Discovery and development of new species for vermiculture. In: EDWARDS, C. A.; ARANCON, N. Q.; SHERMAN, R. L. (Ed.). **Vermiculture technology: earthworms, organic wastes and environmental management**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 41-52.
- JÄNSCH, S.; AMORIM, M. J. B.; RÖMBKE, J. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. **Environmental Reviews**, v. 13, p. 51-83, 2005a. DOI: 10.1139/a05-007.
- JÄNSCH, S.; RÖMBKE, J.; DIDDEN, W. The use of enchytraeids in ecological soil classification and assessment concepts. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 266-277, 2005b. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2004.10.025.
- JENSEN, J.; MESMAN M. (Ed.). **Eco logical risk assessment of contaminated land: decision support for site specific investigations**. [S.], 2006. (RIVM Report, 711701047).
- KOLAR, L.; KOŽUH ERŽEN, N.; HOGERWERF, L.; VAN GESTEL, C. A. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. **Environmental Pollution**, v. 151, n. 1, p. 182-189, 2008. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.02.011.
- KULA, H.; LARINK, O. Development and standardization of test methods for the prediction of sublethal effects of chemicals on earthworms. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 635-639, 1997. DOI: 10.1016/S0038-0717(96)00030-2.
- KUPERMAN, R. G.; AMORIM, M. J. B.; RÖMBKE, J.; LANNO, R.; CHECKAI, R. T.; DODARD, S. G.; SUNAHARA, G. I.; SCHEFFCZYK, A. Adaptation of the enchytraeid toxicity test for use with natural soil types. **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p. S234-S243, 2006. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2006.07.028.
- KUPERMAN, R. G.; CHECKAI, R. T.; SIMINI, M.; PHILLIPS, C. T. Manganese toxicity in soil for *Eisenia fetida*, *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta), and *Folsomia candida* (Collembola). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 48-53, 2004.
- LANGDON, C. J.; HODSON, M. E.; ARNOLD, R. E.; BLACK, S. Survival, Pb-uptake and behaviour of three species of earthworm in Pb treated soils determined using an OECD-style toxicity test and a soil avoidance test. **Environmental Pollution**, v. 38, n. 2, p. 368-375, 2005. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.03.002.
- LAVELLE, P.; BIGNELL, D.; LEPAGE, M. Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. **European Journal of Soil Biology**, v. 33, p. 159-193, 1997.
- LIMA, N. C. **Avaliação do impacto da contaminação do solo de áreas agrícolas de Bom Repouso (MG) por meio de ensaios ecotoxicológicos**. 2010. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Universidade de São Paulo, São Carlos.
- LOCK, K.; JANSSEN, C. R. Cadmium toxicity for terrestrial invertebrates: taking soil parameters affecting bioavailability into account. **Ecotoxicology**, v. 10, n. 5, p. 315-322, 2001. DOI: 10.1023/A:1016767519556.
- MENEZES-OLIVEIRA, V. B.; BIANCHI, M.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Hazard assessment of the pesticides KRAFT 36 EC and SCORE in a tropical natural soil using an ecotoxicological test battery. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 2919-2924, 2018. DOI: 10.1002/etc.4056.
- MENEZES-OLIVEIRA, V. B.; LOUREIRO, S.; AMORIM, M. J. B.; WRONA, F.; SOARES, A. M. Hazard assessment of the veterinary pharmaceuticals monensin and nicarbazin using a soil test battery. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2018. DOI: 10.1002/etc.4265.
- MESTRINHO, C. C. **Toxicidade aguda e repelência do fungicida oxicloreto de cobre para *Eisenia fetida* e *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

MEYER, A. R.; RÖMBKE, J.; MOSER, T.; RATTE, H. T. Statistical results and implications of the Enchytraeid reproduction ringtest. **Environmental Science and Technology**, v. 36, p. 2116-2121, 2002.

MOSER, H.; ROEMBKE, J.; DONNEVERT, G.; BECKER, R. Evaluation of biological methods for a future methodological implementation of the Hazard criterion H14 'ecotoxic' in the European waste list (2000/532/EC). **Waste Management & Research**, v. 29, n. 2, p. 180-187, 2011. DOI: 10.1177/0734242X10367844.

NATAL-DA-LUZ, T.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J. P. Avoidance test with Collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9, p. 2188-2193, 2004.

NIEMEYER, J. C.; CARNIEL, L. S. C.; DE SANTO, F. B.; SILVA, M.; KLAUBERG-FILHO, O. Boric acid as reference substance for ecotoxicity tests in tropical artificial soil. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 4, 395-401, 2018a. DOI: 10.1007/s10646-018-1915-7.

NIEMEYER, J. C.; CHELINHO, S.; SOUSA, J. P. Soil ecotoxicology in Latin America: current research and perspectives. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 7, 1795-1810, 2017. DOI: 10.1002/etc.3792.

NIEMEYER, J. C.; DE SANTO, F. B.; GUERRA, N.; RICARDO-FILHO, A. M.; PECH, T. M. Do recommended doses of glyphosate-based herbicides affect soil invertebrates? Field and laboratory screening tests to risk assessment. **Chemosphere**, v. 198, p. 154-160, 2018b. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.01.127.

NIEMEYER, J. C.; MOREIRA SANTO, M.; NOGUEIRA, M. A.; CARVALHO, G. M.; RIBEIRO, R.; SILVA, E. M.; SOUSA, J. P. Environmental risk assessment of a metal-contaminated area in the tropics. Tier I: Screening phase. **Journal of Soils and Sediments**, v. 10, n. 8, p. 1557-1571, 2010. DOI: 10.1007/s11368-010-0255-x.

NIVA, C. C.; KOVALSKI, R.; BROWN, G. G. Adaptação do ensaio ecotoxicológico com enquitreídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 11., 2010, Bombinhas. **Anais...** Brisbane: International Union of Soil Science: ASSSI, 2010b.

NIVA, C. C.; KOVALSKI, R.; BROWN, G. G. Enquitreídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta) como organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 11., 2010, Bombinhas. **Anais...** Brisbane: International Union of Soil Science: ASSSI, 2010c.

NIVA, C. C.; NIEMEYER, J. C.; SILVA JÚNIOR, F. M. R.; NUNES, M. E. T.; DE SOUSA, D. L.; ARAGÃO, C. W. S.; SAUTTER, K. D.; ESPINDOLA, E. G.; SOUSA, J. P.; RÖMBKE, J. Soil ecotoxicology in Brazil is taking its course. **Environmental Science and Pollution**, v. 23, n. 11, p. 11363-11378, 2016. DOI: 10.1007/s11356-016-6597-1.

NIVA, C. C.; RÖMBKE, J.; SCHMELZ, R.; BROWN, G. G. Enquitreídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). In MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. (Ed.). **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA, Lavras, 2010a. p. 351-365.

NIVA, C. C.; SCHMELZ, R. M.; BROWN, G. G. Notes on the reproduction, fragmentation and regeneration of *Enchytraeus dudichi* Dózsa-Farkas, 1995 sensu lato (Enchytraeidae, Oligochaeta) found in Paraná State, Brazil. **Landbauforschung**, nesp. 357, p. 13-19, 2012. (Newsletter on Enchytraeidae, n. 12).

NUNES, M. E. T. **Avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre a fauna edáfica por meio de ensaios ecotoxicológicos com *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) e com comunidade natural do solo**. 2010. 175 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Universidade de São Paulo.

NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. V. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 1063-1071, 2012. DOI: 10.1007/s10646-012-0859-6.

OLIVEIRA FILHO, L. C. I. D.; BARETTA, D.; ZORTÉA, T.; CASAROTTO, K.; DORS, P.; CAMPOS, M. L.; SANTOS, J. C. P. Ecotoxicological assessment of coal mining waste. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 1806-1813, 2015. DOI: 10.1590/01000683rbscs20150151.

OLIVEIRA FILHO, L. C. I.; BARETTA, D.; ZORTEA, T.; OLIVEIRA, J. P. M.; SANTOS, J. C. P. Resíduo piritoso provoca toxicidade aguda e crônica em Collembola e Oligochaeta. **Scientia Agraria**, v. 18, p. 64-75, 2017. DOI: 10.5380/rsa.v17i3.50209.

OLIVEIRA FILHO, L. C. I. de. **Ecological risk assessment and mesofaunal in mining areas**. 2013. 159 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Bioaccumulation in terrestrial oligochaetes**. Paris, 2010. (OECD. Guideline for testing chemicals, 317).

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Earthworm acute toxicity test**. Paris, 1984. 9 p. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 207).

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Earthworm reproduction tests (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*)**. Paris, 2004a. (OECD. Guideline for the testing of chemicals, 222).

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Enchytraeidae reproduction test**. Paris, 2004b. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 220).

OWOJORI, O. J.; REINECKE, A. J.; VOUA-OTOMO, P.; REINECKE, S. A. Comparative study of the effects of salinity on life-cycle parameters of four soil-dwelling species (*Folsomia candida*, *Enchytraeus doerjesi*, *Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*). **Pedobiologia**, v. 52, p. 351-360, 2009. DOI: 10.1016/j.pedobi.2008.12.002.

PAPINI, S.; ANDRÉA, M. M. Ação de minhocas *Eisenia foetida* sobre a dissipação dos herbicidas simazina e paraquat aplicados no solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 67-73, 2004. 10.1590/S0100-06832004000100007.

PAPINI, S.; ANDRÉA, M. M. Dissipação de simazina em solo por ação de minhocas (*Eisenia foetida*). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 593-599, 2001. 10.1590/S0100-06832001000300008.

PASHANASI, B. Producción masiva de lombrices de tierra (*Pontoscolex corethrurus*) en la Amazonía Peruana. In: BROWN, G. G.; FRAGOSO, C. (Ed.). **Minhocas na América Latina: biodiversidade e ecologia**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. p. 519-523.

PEIJNENBURG, W. J. G. M.; POSTHUMA, L.; ZWEERS, P. G. P. C.; BAERSELMANN, R.; DE GROOT, A. C.; VAN VEEN, R. P. M.; JAGER, T. Prediction of metal bioavailability in Dutch field soils for the oligochaete *Enchytraeus crypticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 43, p.170-186, 1999. DOI: 10.1006/eesa.1999.1773.

POSTHUMA, L.; BAERSELMAN, R.; VAN VEEN, R. P. M.; DIRVEN VAN BREEMEN, E. M. Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 38, p. 108-121, 1997. DOI: 10.1006/eesa.1997.1568.

REINECKE, A. J.; MABOETA, M. S.; VERMEULEN, L. A.; REINECKE, S. A. Assessment of lead nitrate and mancozeb toxicity in earthworms using the avoidance response. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, p. 779-789, 2002. DOI: 10.1007/s00128-002-0023-8.

- RIGHI, G. *Pontoscolex* (Oligochaeta, Glossoscolecidae), a new evaluation. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 19, p. 159-177, 1984.
- RÖMBKE, J. Ecotoxicological tests with enchytraeids: a review. **Pedobiologia**, v. 47, n. 5/6, p. 607-616, 2003. DOI: 10.1078/0031-4056-00235.
- RÖMBKE, J.; COLLADO, R.; SCHMELZ, R. M. Abundance, distribution and indicator potential of enchytraeid genera (Enchytraeidae, Clitellata) in secondary forests and pastures of the Mata Atlântica. **Acta Hydrobiologica Sinica**, v. 31, p. 139-150, 2007.
- RÖMBKE, J. Enchytraeidae of tropical soils: State of art: with special emphasis on Latin America. **Folia Facultatis Scientiarum Naturalium Universitatis Masarykianae Brunensis**, Biologia, v. 110, p. 157-181, 2007.
- RÖMBKE, J.; JÄNSCH, S.; DIDDEN, W. The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 249-265, 2005. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2005.03.027.
- RÖMBKE, J.; JÄNSCH, S.; JUNKER, T.; POHL, B.; SCHEFFCZYK, A.; SCHALLNASS, H. Improvement of the applicability of ecotoxicological tests with earthworms, springtails, and plants for the assessment of metals in natural soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, p. 776-787, 2006a.
- RÖMBKE, J.; KROG, K. A.; MOSER, T.; SCHEFFCZYK, A.; LIEBIG, M. Effects of the veterinary pharmaceutical Ivermectin on soil invertebrates in laboratory tests. **Archives Environmental Toxicology Chemistry**, v. 58, p. 332-340, 2010. DOI: 10.1007/s00244-009-9414-8.
- RÖMBKE, J.; MOSER, T. Validating the enchytraeid reproduction test: organization and results of an international ringtest. **Chemosphere**, v. 46, p. 1117-1140, 2002.
- RÖMBKE, J.; NOTENBOOM, J.; POSTHUMA, L. The effects of zinc on enchytraeids. The Budel case study. **Natura Jutlandica Occasional Papers**, v. 2, p. 54-67, 2002.
- RÖMBKE, J.; SCHMELZ, R. M.; PELOSI, C. Effects of organic pesticides on enchytraeids (Oligochaeta) in agroecosystems: laboratory and higher-tier tests. **Frontiers in Environmental Science**, v. 5, p. 20, 2017. DOI: 10.3389/fenvs.2017.00020.
- RÖMBKE, J.; SOUSA, J. P.; SCHOUTEN, T.; RIEPERT, F. Monitoring of soil organisms: a set of standardized field methods proposed by ISO. **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p. S61-S64, 2006b. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2006.07.016.
- SALANITRO, J. P.; DORN, P. B.; HUESEMAN, M. H.; MOORE, K. O.; RHODES, I. A.; JACKSON, L. M. R.; VIPOND, T. E.; WESTERN, M.; WISNIEWSKI, H. L. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. **Environmental Science & Technology**, v. 31, p. 1769-1776, 1997. DOI: 10.1021/es960793i.
- SCHMELZ, R. M.; COLLADO, R. *Enchytraeus luxuriosus* sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). **Carolinea**, v. 57, p. 93-100, 1999.
- SCHMELZ, R. M.; NIVA, C. C.; RÖMBKE, J.; COLLADO, R. Diversity of terrestrial Enchytraeidae (Oligochaeta) in Latin America: current knowledge and future research potential. **Applied Soil Ecology**, v. 69, p.13-20, 2013.
- SCORIZA, R. N.; CORREIA, M. E. F. Ecotoxicologia e mesofauna do solo em área com histórico de derramamento de óleo na Floresta Nacional Ipanema. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 13, n. 1, p. 5495, 2018. DOI: 10.5039/agraria.v13i1a5495.
- SCORIZA, R. N.; SILVA, A. D. P.; CORREIA, M. E. F.; LELES, P. S. D. S.; RESENDE, A. S. D. Herbicide use in degraded forest areas in restoration: effects on soil invertebrate biota. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 1576-1584, 2005. DOI: 10.1590/01000683rbc20150096.

SCOTT-FORDSMAN, J. J.; KROGH, P. H.; SCHAEFER, M.; JOHANSEN, A. The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to *Eisenia veneta* earthworms. **Ecotoxicology & Environmental Safety**, v. 71, p. 616-619, 2008. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2008.04.011.

SEGAT, J. C. **Avaliação ecotoxicológica da aplicação de dejetos líquido de suínos em solos subtropicais**. 2016. Tese (Doutorado em Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

SEGAT, J. C. **Avaliação ecotoxicológica do uso de dejetos de suínos em solos de Santa Catarina**. 2012. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

SEGAT, J. C.; ALVES, P. R.; BARETTA, D.; CARDOSO, E. J. B. N. Ecotoxicological evaluation of swine manure disposal on tropical soils in Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 91-97, 2015. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.07.017.

SILVA, R. F.; AQUINO, A. M.; MERCANTE, F. M.; GUIMARÃES, M. F. Populações de oligoquetos (Annelida: Oligochaeta) em um Latossolo Vermelho submetido a sistemas de uso do solo. **Ciência Rural**, v. 36, p. 673-677, 2006. DOI: 10.1590/S0103-84782006000200051.

SISINNO, C. L. S.; BULUS, M. R.; RIZZO, A. C. L.; MOREIRA, J. C. Ensaio de comportamento com minhocas (*Eisenia fetida*) para avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares para contaminação por hidrocarbonetos. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, p. 137-140, 2006.

SISINNO, C. L. S.; RIZZO, A. C. L.; BULUS, M. R.; ROCHA, D. A.; SORIANO, A. U.; VITAL, R. L.; MOREIRA, J. C. Application of ecotoxicological tests in a preliminary evaluation of soils treated on bioreactor. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, p. 157-161, 2007.

SOUSA, A. P. A.; ANDRÉA, M. M. Earthworm (*Eisenia andrei*) avoidance of soils treated with cypermethrin. **Sensors**, v. 11, p. 11056-11063, 2011. DOI: 10.3390/s111211056.

SOUSA, A. P. A. **Influência de três tipos de solos sobre o efeito do inseticida cipermetrina em minhocas *Eisenia andrei***. 2010. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia - Instituto Biológico, São Paulo).

SPURGEON, D. J.; WEEKS, J. M.; VAN GESTEL, C. A. M. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. **Pedobiologia**, v. 47, p. 588-606, 2003. DOI: 10.1078/0031-4056-00234.

STOJANOVIĆ, M.; KARAMAN, S.; MILUTINOVIĆ, T. Herbicide and pesticide effects on the earthworm species *Eisenia foetida* (Savigny, 1826)(Oligochaeta, Lumbricidae). **Archives of Biological Sciences**, v. 59, n. 2, p. 25-26, 2007. DOI: 10.1590/S0100-06832010000100006.

VAMPRÉ, T. M.; FUCILLO, R.; ANDRÉA, M. M. Oligoqueta *Eisenia andrei* como bioindicador de contaminação de solo por hexaclorobenzeno. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 59-66, 2010. DOI: 10.1590/S0100-06832010000100006.

WESTHEIDE, W.; GRAEFE, U. Two new terrestrial *Enchytraeus species* (Oligochaeta, Annelida). **Journal of Natural History**, v. 26, p. 479-488, 1992. DOI: 10.1080/00222939200770311.

WILLUHN, J.; SCHMITT-WREDE, H. P.; OTTO, A.; WUNDERLICH, F. Cadmium-detoxification in the earthworm *Enchytraeus*: specific expression of a putative aldehyde dehydrogenase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 226, n. 1, p. 128-134, 1996. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1321.

ZIRBES, L.; MESCHER, M.; VRANCKEN, V.; WATHELET, J. -P.; VERHEGGEN, F. J.; THONART, P.; HAUBRUGE, E. Earthworms use odor cues to locate and feed on microorganisms in soil. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. 1-6, e21927, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0021927.