

# Ensaio de reprodução (ecotoxicidade crônica) com oligoquetas

# 12

Paulo Roger Lopes Alves  
Maria Edna Tenório Nunes  
Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso  
Cintia Carla Niva  
Julia Carina Niemeyer  
Julia Corá Segat  
José Paulo Sousa  
Jörg Römbke

Os ensaios de ecotoxicidade crônica, em contraste aos de ecotoxicidade aguda, são realizados com a finalidade de determinar efeitos na reprodução, crescimento e comportamento de organismos, decorrentes de perturbações fisiológicas e bioquímicas (Rida; Bouché, 1997). Embora os testes de toxicidade aguda sejam úteis para identificar substâncias químicas tóxicas, eles não avaliam os efeitos sobre os principais eventos do ciclo de vida dos organismos-testes, durante os quais a sensibilidade a compostos tóxicos pode ser pronunciada (Hoffman et al., 2003).

Da mesma forma que para os ensaios de ecotoxicidade aguda (ver capítulo 11), há normas internacionais que descrevem metodologias-padrão para estudar a ecotoxicidade crônica de poluentes a organismos terrestres. Essas metodologias padronizam os ensaios que avaliam o efeito sobre a reprodução de oligoquetas e estão disponíveis para espécies consideradas modelo na ecotoxicologia terrestre. Entre elas destacam-se as normas nº 222 e nº 11268-2 da Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD) (2004a) e da International Organization for Standardization (ISO) (1998), respectivamente, para as espécies de minhocas *Eisenia fetida* e *E. andrei*, e ISO 16387 (ISO, 2014), para enquitreídeos do gênero *Enchytraeus*. Existem ainda métodos recomendados pela Environment Canada (EC) para ensaios com minhocas (Canada, 2004). O princípio dos ensaios para as distintas espécies é o mesmo, contudo, os procedimentos seguem particularidades de acordo com as características biológicas do organismo-teste, as quais serão detalhadas adiante.

Apesar de se conhecer a sensibilidade e importância desse tipo de ensaio nas avaliações do risco de toxicidade, estas metodologias têm sido pouco exploradas em países das regiões de clima tropical e subtropical (Cardoso & Alves, 2012). Algumas adaptações aos métodos padronizados (OECD e ISO) têm sido adotadas em termos de substrato e temperatura (Römbke et al., 2007; Nunes; Espíndola, 2012; Alves et al., 2013). Entretanto, a utilização de espécies nativas nesse ensaio ainda encontra entraves, pois a biologia e adequabilidade das espécies ainda não são suficientemente conhecidas. A única espécie de minhoca de ocorrência local com biologia razoavelmente conhecida no momento, *P. corethrurus*, apresenta um ciclo de vida de aproximadamente 12

meses a 20 °C (ver seção 4.4), período longo demais para o ensaio de reprodução dentro dos padrões recomendados em Solo Artificial Tropical (SAT) (Buch et al., 2011). Contudo, sob temperaturas maiores, a reprodução é mais rápida, e um aumento da temperatura para  $\geq 22$  °C e do tempo do ensaio para 90 dias poderia viabilizar o ensaio com essa espécie e sua comparação com *E. andrei* ou *E. fetida* (ver Buch et al., 2017).

A seguir, descrevemos o procedimento para condução do ensaio de ecotoxicidade crônica (reprodução) para *E. fetida* e *E. andrei* seguindo, basicamente, as normas ISO 11268-2 (ISO, 2012) e OECD 222 (OECD, 2004a) e, para enquitreídeos, *Enchytraeus* sp., as normas ISO 16387 (ISO, 2014) e OECD 220 (OECD, 2004b). Ao longo do texto, foram incluídas observações sobre as adaptações recomendadas para condições tropicais, como as do Brasil.

## 12.1 Princípio do ensaio de reprodução

Organismos adultos são expostos a uma gama de concentrações de uma substância-teste, em um substrato (solo artificial, natural, ou ainda em amostras de solo provenientes de áreas contaminadas) e então são determinados os efeitos na reprodução em termos de número de juvenis produzidos e, no caso de minhocas, também no crescimento (biomassa corporal).

O percentual de sobrevivência dos adultos é determinado 28 dias após o início do ensaio para minhocas e, após 14 dias (ou 7 dias), para enquitreídeos, havendo exigências mínimas de sobrevivência nos controles para a validação dos ensaios. Os efeitos sobre a reprodução são avaliados pela contagem do número de juvenis, normalmente, nascidos aos 56 dias (minhocas), e aos 28 ou 42 dias (enquitreídeos), entretanto, estes períodos podem variar de acordo com o ciclo de vida de cada espécie.

No caso de ensaios com uma substância-teste da qual ainda não se conhece a concentração capaz de provocar algum efeito negativo na reprodução, recomenda-se a realização do ensaio em duas etapas, uma preliminar e outra definitiva. O objetivo do ensaio preliminar é determinar a faixa de concentrações subletais que serão utilizadas no teste definitivo. Neste segundo momento serão determinadas as concentrações da substância-teste que afetam apenas a reprodução do organismo.

## 12.2 Ensaio de reprodução de minhocas

### 12.2.1 Organismo-teste

Assim como nos ensaios de letalidade (ver capítulo 11), minhocas adultas (com clitelo aparente) das espécies *E. andrei* e *E. fetida*, com peso individual

entre 300 e 600 mg, são utilizadas nos ensaios de reprodução (ecotoxicidade crônica). Os organismos devem ser obtidos a partir de uma criação padrão (ver seção 4.1.3) e os demais cuidados e procedimentos de preparação para os ensaios são idênticos aos descritos no capítulo do ensaio de letalidade (ver seção 11.2).

Visando evitar uma alta variabilidade nas taxas de reprodução, decorrentes de grandes diferenças na idade dos organismos utilizados nos ensaios de reprodução, recomenda-se utilizar apenas adultos, com idade entre dois meses e um ano de idade, provenientes de culturas sincronizadas, ou seja, aqueles em que as minhocas tenham idade e biomassa parecidas. Para tanto, deve-se iniciar as culturas com casulos, como descrito na seção 4.1.3.

### 12.2.2 Recipientes-teste e equipamentos

Os equipamentos são os mesmos utilizados no ensaio de letalidade. Porém, um equipamento para banho-maria é recomendado para facilitar a extração e contagem dos juvenis aos 56 dias de ensaio (Figura 12.1).

### 12.2.3 Preparo do solo- ou substrato-teste

O preparo do conteúdo dos recipientes e a instalação dos ensaios de toxicidade crônica com minhocas são semelhantes aos descritos para a avaliação da toxicidade aguda (ver seção 11.2). Da mesma forma, devem ser seguidas as recomendações de faixa ideal de pH do substrato-teste (ver seção 7.5), peso e idade dos organismos, formas de aplicação das substâncias a serem testadas (ver capítulo 8), tipo de recipientes utilizados e a manutenção semanal dos experimentos. Contudo, neste caso, recomenda-se que, antes de iniciar o experimento, seja misturada ao substrato-teste uma fonte de alimento.

### 12.2.4 Ensaio preliminar de reprodução de minhocas

A principal função deste ensaio é determinar as concentrações subletais, que possivelmente causam algum efeito prejudicial à reprodução dos organismos. Os procedimentos para realização do mesmo estão descritos na seção 11.2.5 (minhocas).

### 12.2.5 Ensaio definitivo de reprodução de minhocas

O procedimento de instalação do ensaio definitivo é o mesmo descrito para o ensaio de letalidade, na seção 11.2. Contudo, a manutenção e a forma de avaliação são diferentes. No caso de ensaios com aplicação de substâncias ao substrato, devem ser avaliadas pelo menos cinco diferentes concentrações da substância-teste, calculadas em relação ao peso de substrato seco ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), em série geométrica (ver capítulo 10), além de um tratamento controle, no qual o substrato será tratado com o mesmo solvente utilizado para diluir as dife-

Fotos: Paulo Roger Lopes Alves



**Figura 12.1.** A) Recipientes do ensaio de toxicidade crônica em banho-maria para extração das minhocas juvenis geradas após 56 dias; B) Detalhe da separação dos juvenis provenientes da superfície dos recipientes com solo; C) Contagem manual dos juvenis de *E. andrei* gerados no ensaio de toxicidade crônica.

rentes concentrações da substância-teste (normalmente água), com pelo menos 4 repetições por tratamento.

No ensaio de reprodução as minhocas devem ser alimentadas com 5 g de alimento (5 g de esterco misturado com 5 mL de água deionizada por recipiente) por cada 500 g de solo, no início do ensaio, quando espécies padronizadas, como *E. andrei* e *E. fetida* forem utilizadas. No caso de ensaios com solos naturais, caso os mesmos contenham < 2% de carbono orgânico, adiciona-se a mesma quantidade de alimento. Para as demais espécies, observar hábitos alimentares das mesmas e recomendações de suplementação alimentar em literatura. Caso haja consumo do alimento, ele deve ser repostado na superfície do solo aos sete dias do ensaio, mas se não houver consumo do alimento, não é necessário realimentar as minhocas. Após adicionar os organismos-teste, os recipientes-testes devem ser pesados para o monitoramento e reposição semanal da umidade como descrito no ensaio preliminar.

Após quatro semanas (28 dias) do início do ensaio, deve ser realizada a primeira avaliação. Neste momento, os indivíduos adultos devem ser retirados manualmente, observando-se alterações morfológicas (como afinamento; falta de pigmentação da porção posterior; estrangulamentos em diferentes regiões do corpo; fragmentação e perda de segmentos), comportamentais (letargia ou lentidão na resposta a estímulos mecânicos) e o número de sobreviventes em cada recipiente-teste. Os sobreviventes devem ser pesados, individualmente, em balança analítica, para obter os valores da biomassa corporal. Após a retirada dos adultos, o solo, junto aos eventuais casulos e juvenis, deve retornar aos recipientes-testes, os quais devem ser mantidos por mais 28 dias sob as mesmas condições do início do ensaio.

Após 56 dias do início do ensaio faz-se a contagem do número de juvenis gerados para avaliar os efeitos causados pela substância-teste na reprodução dos organismos. Para isto, os recipientes-testes, sem as tampas, devem ser mantidos em banho-maria (Figura 12.1A) a temperaturas entre 55 °C e 65 °C, por um período de 20 a 30 minutos (ISO, 1998). Há casos nos quais este período no banho-maria é insuficiente e, nestas situações, recomenda-se aguardar até uma hora. Devido ao gradiente de calor produzido dentro do substrato, os juvenis presentes sobem até a superfície e podem ser facilmente extraídos. Na sequência, os juvenis são separados manualmente e contados (Figuras 12.1B e C).

Como o ensaio de reprodução tem longa duração (8 semanas), é imprescindível que se mantenha a umidade dos substratos corrigida, assim como deve ser realizada uma suplementação de alimento para que os organismos mantenham taxas suficientes de reprodução e crescimento. Para tanto, imediatamente após a inserção dos substratos nos recipientes-testes, no momento de instalação do ensaio, cada recipiente deve ser pesado e o peso anotado. Semanalmente, durante todo o período do ensaio, após nova pesagem, devem ser adicionadas quantidades de água correspondentes às perdas em relação à semana anterior. Estercos bovino ou equino (secos e peneirados) são sugere-

ridos para suplementar a alimentação dos organismos, semanalmente, durante o ensaio. Recomenda-se que sejam fornecidos 5 g de esterco (seco) umedecido com 5 mL de água para cada porção de 500 g (matéria seca) do substrato-teste, se houver consumo, independentemente do solo-teste utilizado (natural ou artificial). A Environmental Canada ainda recomenda o uso de aveia em flocos cozida para alimentação dos organismos (Canada, 2004).

Após o final do ensaio de reprodução definitivo, será possível determinar a maior concentração da substância-teste que, quando misturada ao solo, não causa efeito significativo na biomassa dos adultos e no número de juvenis gerados, quando comparado ao controle (Concentração de Efeito Não Observado - CENO), e a menor concentração que causa efeito significativo (Concentração de Efeito Observado - CEO). Além disso, através do uso de regressões não lineares, é possível estimar as concentrações (Concentração Efetiva - CE) em que 50% e 20% (CE50 e CE20) da taxa reprodutiva são reduzidas. Detalhes sobre o cálculo e a expressão dos resultados estão descritos na seção 12.4 e no capítulo 14.

### 12.2.6 Substância de referência

Para confirmar e monitorar a sensibilidade das minhocas como organismos bioindicadores, é necessário realizar um ensaio de toxicidade crônica com o ácido bórico, substância de referência para *E. fetida* e *E. andrei* (ISO, 2012). Quando misturado ao substrato, efeitos significativos ( $\alpha = 0,05$ ) na reprodução deverão ser observados em concentrações entre 400 a 600 mg i.a. (ingrediente ativo - ácido bórico) por kg de substrato seco. Este ensaio deve ser conduzido de acordo com o procedimento descrito na seção 12.2.5. (Ensaio definitivo), no mínimo, uma vez ao ano.

No trabalho realizado por Niemeyer et al. (2018), *E. andrei* apresentou CE50 de 242 e 281 mg kg<sup>-1</sup> de ácido bórico em SAT com 5% de matéria orgânica, em ensaio de reprodução, com intervalo de confiança na faixa de 172 a 343 mg kg<sup>-1</sup> considerando os dois casos. Esses trabalhos com SAT demonstram valores menores do que com o solo artificial OCDE com 10% de matéria orgânica para o efeito sobre a reprodução (ISO, 2012), CE50 de 433 mg kg<sup>-1</sup> (Stantec, 2004) e 484 mg kg<sup>-1</sup> (Becker et al., 2011). Aparentemente os valores de CE50 com SAT são menores que em solo artificial OCDE, entretanto, são necessários mais estudos para se estabelecer a faixa de sensibilidade para ensaios com o solo tropical.

O carbendazim, um fungicida de classificação toxicológica: classe III (ANVISA - Consulta Pública nº 113, de 19 de dezembro de 2007) (Anvisa, 2007), era a substância de referência utilizada anteriormente, porém o seu uso foi proibido em diversos países. Deste modo, optou-se por uma substância que oferecesse menor risco e que fosse comercialmente disponível.

## 12.2.7 Resumo dos requisitos e cronograma do ensaio de reprodução de minhocas

A Tabela 12.1 apresenta um resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade crônica (reprodução) com *E. fetida* e *E. andrei*. O cronograma de execução do ensaio é descrito na Tabela 12.2.

**Tabela 12.1.** Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade crônica com minhocas.

Requisitos	Especificação
Tipo de ensaio	Ecotoxicidade crônica; reprodução.
Referências	OECD 222 (OECD, 2004a); ISO 11268-2 (ISO, 2012).
Duração total	56 dias.
Organismo-teste	Minhocas <i>Eisenia fetida</i> ou <i>E. andrei</i> (adultos, com peso individual entre 300 mg e 600 mg).
Alimentação	5 g de esterco (seco) com 5 mL de água (semanalmente).
Substrato	Solo artificial/natural ou de áreas contaminadas.
Quantidade de solo por recipiente	500 g (material seco) – ISO/OECD. Obs.: 750 g (ABNT, 2007) e 200 g para recipientes de 473 mL (ASTM, 2004).
Ambiente de ensaio	Câmara ou sala climatizada, com temperatura e fotoperíodo controlados (ver capítulo 9).
Número recomendado de concentrações	5 e um controle.
Número mínimo de repetições/tratamento	4
Número de organismos por repetição	10
Efeito observado	Alteração na biomassa e no número de juvenis gerados.
Expressão dos resultados	CENO, CEO, CE50/CE20 em 56 dias. Além de: tóxico ou não tóxico
Crítérios de validade	Tratamento controle com: produção de no mínimo 30 juvenis por réplica; mortalidade < 10% e coeficiente de variação < 30%.
Substância de referência	Ácido bórico: CE50 = 400 mg a 600 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> kg <sup>-1</sup> de solo artificial OCDE (massa seca) (ISO, 2012); valores para SAT discutidos na seção 12.2.6. Carbendazim: em desuso.

**Tabela 12.2.** Cronograma de execução do ensaio de toxicidade crônica com minhocas *Eisenia fetida* e *E. andrei*.

<b>Etapas</b>	<b>Período</b>	<b>Atividade a ser desenvolvida</b>
Preparo do material	2 meses antes do início	- Sincronização das culturas para obtenção de organismos com idade e biomassa corporal semelhante.
	3 dias antes do início	- Preparo do substrato (ver capítulo 7 e seção 11.2.4).
	1-2 dias antes do início	- Determinação do pH do substrato (ver seção 7.5). - Determinação da CRA (ver seção 7.4). - Seleção de organismos para aclimação (ver seções 11.2.1 e 11.2.2).
Montagem do ensaio	Dia 1	Seguir as recomendações descritas para o ensaio de letalidade (ver seção 11.2): - Preparação da solução estoque. - Aplicação da substância-teste e homogeneização do solo com solução/suspensão. - Pesagem do substrato-teste nos recipientes-teste. - Adição de alimento no substrato-teste. - Introdução dos organismos. - Determinação do pH e pesagem dos recipientes (contendo o solo e os organismos).
	Dia 7	- Verificação do alimento e umidade (diferença de peso do dia 1).
	Dia 14	- Verificação do alimento e umidade (diferença de peso do dia 7).
	Dia 21	- Verificação do alimento e umidade (diferença de peso do dia 14).
	Dia 28	- Determinação da mortalidade, remoção e pesagem dos adultos (ver seção 11.2.8). - Observação de alterações morfológicas e no comportamento das minhocas. - Determinação do pH (ver seção 7.5). - Verificação do alimento e umidade (diferença de peso do dia 21). - Dispor apropriadamente das minhocas, de acordo com os requerimentos legais (ver capítulo 16).
	Dia 35	- Verificação do alimento e umidade (diferença de peso do dia 28).
	Dia 42	- Verificação do alimento e umidade (diferença de peso do dia 35).
Monitoramento e avaliações (Ensaio preliminar e definitivo)	Dia 56	- Extrair juvenis do solo-teste e realizar contagem manual (ver seção 12.2.5). - Determinação do pH (ver seção 7.5). - Dispor apropriadamente das minhocas e solos, de acordo com os requerimentos legais (ver capítulo 16).

### 12.2.8 Validação do ensaio

Para que o ensaio de reprodução com *E. fetida* e *E. andrei* seja considerado válido, as normas OECD no 222 (OECD, 2004a) e ISO 11268-2 (ISO, 1998) recomendam que três critérios sejam preenchidos. Esses critérios se aplicam aos dados de reprodução nos controles:

1. Em cada réplica deve haver, no mínimo, 30 indivíduos no final do teste.
2. O coeficiente de variação deve ficar inferior a 30%.
3. A mortalidade de minhocas adultas, aos 28 dias, deve ser  $\leq 10\%$ .

## **12.3 Ensaio de reprodução de *Enchytraeus* sp.**

### **12.3.1 Organismo-teste (ver seção 11.3.1)**

### **12.3.2 Recipientes-teste e equipamentos (ver seção 11.3.2)**

### **12.3.3 Ensaio preliminar de reprodução de *Enchytraeus* sp.**

O teste preliminar ao ensaio de reprodução é idêntico ao preliminar de letalidade (seção 11.3), porém, como o objetivo neste ensaio é encontrar a faixa de concentrações subletais, mais atenção deve ser dada à presença e ausência de juvenis nas concentrações testadas, ao final do ensaio preliminar. Esses dados auxiliarão na determinação das concentrações a serem usadas no ensaio definitivo de toxicidade crônica.

### **12.3.4 Ensaio definitivo de reprodução de *Enchytraeus* sp.**

O ensaio definitivo deve seguir um dos esquemas experimentais descritos no capítulo 10. O ensaio de reprodução com enquitreídeos é normalmente conduzido incluindo-se também, uma avaliação do efeito letal das concentrações testadas após a metade do tempo de duração do ensaio, como descrito na seção 11.3.5. A duração total do ensaio de reprodução é de seis semanas (42 dias) para *E. albidus* e quatro semanas (28 dias) para *E. crypticus*. Os adultos são alimentados uma vez por semana com aproximadamente 50 mg de aveia moída e autoclavada, no início do ensaio e, posteriormente, com aproximadamente 25 mg por recipiente-teste. Para avaliação da letalidade, após 14 dias, espalha-se o substrato-teste sobre um recipiente raso (bandeja pequena, placa de Petri de 15 cm de diâmetro ou pedaço de folha de papel alumínio etc.) e examina-se, cuidadosamente, com o auxílio de uma pinça (ou gancho, alça, ou um pincel fino) para contar, quantos dos 10 adultos expostos inicialmente sobreviveram em cada recipiente-teste. Os adultos são retirados e o mesmo substrato-teste, juntamente com os casulos depositados, são reincubados sob as mesmas condições até completar o tempo de exposição necessário (três semanas adicionais para *E. albidus* e duas, para *E. crypticus*) para o ensaio de reprodução. A remoção dos adultos deve ser rápida para evitar o ressecamento do substrato e dos juvenis já eclodidos. A adição de alimento deve continuar por mais uma semana.

O ensaio de reprodução com *E. crypticus* pode ser conduzido por quatro semanas ininterruptas (28 dias) sem a remoção dos adultos após 14 dias (Chelinho et al., 2011). Nesse caso, a avaliação de mortalidade não é feita pois,

ao final da quarta semana, não é possível diferenciar com precisão os adultos parentais dos seus descendentes. Ressalta-se, ainda, que em temperaturas mais altas, condizentes com o clima subtropical e tropical ( $> 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), o ciclo de vida dos enquitreídeos será provavelmente mais rápido e, portanto, o número de juvenis produzidos durante o período do ensaio de 28 dias será maior, o que poderá tornar o processo de contagem muito mais laborioso. A redução da duração do ensaio de reprodução em temperaturas mais altas pode ajudar desde que os critérios de validade do teste (ver seção 12.3.8) sejam atendidos. Castro-Ferreira et al. (2012) demonstraram que o tempo de exposição pode ser reduzido para 21 dias para *E. crypticus*, devido ao curto ciclo de vida da espécie, e Oliveira-Filho et al. (2018) constataram a viabilidade de se utilizar apenas 21 dias para esta espécie com SAT. Ensaio de reprodução com outra espécie de *Enchytraeus* coletada no Paraná também foram realizados com três semanas, alcançando os critérios de validação recomendados (Assis, 2015; Oliveira-Filho et al., 2017).

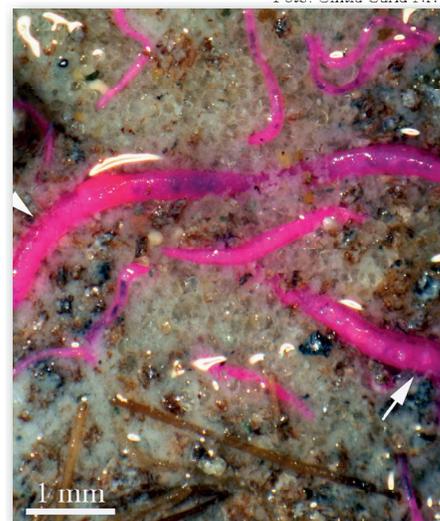
### 12.3.5 Método de fixação, coloração e contagem de *Enchytraeus* sp.

Os enquitreídeos juvenis são muito pequenos e não tem pigmentação conspícua, sendo difíceis de serem visualizados mesmo quando fixados. Porém, métodos de coloração facilitam bastante a sua visualização. Os juvenis são fixados adicionando-se etanol ao recipiente teste até cobrir o substrato e algumas gotas do corante vermelho (ou rosa) de Bengala (solução 1% em etanol) ou eosina (2%), o suficiente para que o etanol fique rosado. Após 12 horas, os enquitreídeos estarão coloridos e poderão ser facilmente visualizados. Para contagem, espalha-se o conteúdo do recipiente-teste sobre uma bandeja ou placa de Petri, remove-se o excesso de etanol e contam-se os enquitreídeos sob um microscópio estereoscópio (Figura 12.2). Os recipientes com solo e etanol, devidamente tampados, podem ser preservados em geladeira ou local fresco por várias semanas até que se faça a contagem. Esses e outros métodos para contagem de juvenis estão descritos na norma NBR ISO 16387 (ABNT, 2012). Após a contagem, o descarte de material deve ser feito conforme o capítulo 16.

### 12.3.6 Substância de referência

Assim como visto para as minhocas, para verificar se a resposta do organismo teste tem se mantido ao longo do tempo e se as condições do laboratório estão adequadas, a norma NBR ISO 16387 (ABNT, 2012) recomenda que a CENO e/ou CEX de uma substância referência seja determinada periodicamente (duas vezes ao ano) ou em paralelo com a avaliação de toxicidade de outra substância. Neste caso, o fungicida carbendazim costumava ser utilizado como substância de referência (controle positivo), pois afeta a reprodução dos enquitreídeos. A CE50 (reprodução-42 dias) de *E. albidus* é de  $1,2 \pm 0,8\text{ mg carbendazim kg}^{-1}$  de peso de solo OCDE seco, em teste com temperatura de  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Römbke;

Foto: Cintia Carla Niva



**Figura 12.2.** Enquitreídeos juvenis e adultos fixados em etanol e corados com Rosa de Bengala.

Moser, 1999), enquanto a de *E. crypticus*, nessas mesmas condições, é de  $44 \pm 5 \text{ mg kg}^{-1}$  (Kuperman et al., 2006). O teste deve ser conduzido com duas ou três concentrações próximas a CE50, com oito repetições cada, bem como o mesmo número para o controle (sem a substância). O número esperado de juvenis nessas concentrações deve ser de aproximadamente  $50\% \pm 20\%$ .

Na versão atualizada da norma ISO 16387 de 2014 (ISO, 2014), o ácido bórico passou a ser a substância referência recomendada, devido à proibição do uso do carbendazim. De acordo com essa nova recomendação, o efeito do ácido bórico a concentrações entre 400 mg e 600 mg por quilograma da massa de matéria seca do substrato sobre a reprodução poderá ser testado para comprovar a sensibilidade ( $\alpha = 0.05$ ). Um trabalho mais recente apresentou CE50 para *E. crypticus* de  $165 \text{ mg kg}^{-1}$  de ácido bórico em SAT com 5% de matéria orgânica, para o efeito sobre a reprodução por 28 dias (Niemeyer et al., 2018). Em outro trabalho, *E. crypticus* e uma espécie coletada no estado do Paraná e criada em laboratório, *Enchytraeus* sp. (Schmelz & Niva, espécie nova não publicada) apresentaram CE50 de  $67 \text{ mg kg}^{-1}$  e CE50 de  $57 \text{ mg kg}^{-1}$  de ácido bórico em SAT com 5% de matéria orgânica, respectivamente, em ensaio de reprodução realizado por 21 dias (Assis, 2015; Morais et al., 2016). Esses trabalhos com SAT demonstram valores bem menores do que com o solo artificial OCDE com 10% de matéria orgânica para o efeito sobre a reprodução. Mais estudos são necessários para o estabelecimento da faixa de sensibilidade dos enquitreídeos ao ácido bórico, porém deve-se atentar a uma possível maior sensibilidade, quando em SAT.

### **12.3.7 Resumo dos requisitos e cronograma do ensaio de reprodução de *Enchytraeus* sp.**

Os requisitos e condições recomendados para a condução do ensaio de reprodução estão descritos na Tabela 12.3. O resumo do cronograma para condução do ensaio de reprodução está descrito na Tabela 12.4 para *E. crypticus* e *E. albidus*, que são as espécies mais utilizadas, mas pode ser utilizado para qualquer outra espécie de enquitreídeo que apresente ciclo de vida semelhante.

**Tabela 12.3.** Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade crônica com enquitreídeos.

<b>Requisitos</b>	<b>Condição</b>
Tipo de ensaio	Ecotoxicidade crônica; reprodução.
Referências	NBR/ ISO 16387 (ABNT, 2012); OECD 220 (OECD, 2004b); ISO 16387 (ISO, 2014).
Duração	42 dias (há casos de 21 dias para espécies de ciclo curto).
Organismo-teste	Enquitreídeos adultos com clitelo (espécies do gênero <i>Enchytraeus</i> ).
Alimentação	Aveia em flocos moída autoclavada (50 mg ou menos, dependendo da espécie) (ver seção 11.3.3).
Substrato	Solo artificial/ natural ou de áreas contaminadas
Quantidade de solo por recipiente	20 g (material seco) desde que preencha 2 cm de profundidade.
Ambiente de ensaio	Câmara ou sala climatizada, com temperatura e fotoperíodo controlados (ver capítulo 9).
Número recomendado de concentrações	5 e um controle, para enfoque na CENO, ou 12 e um controle, para enfoque na CE (ver capítulo 10).
Número mínimo de repetições/tratamento	4
Número inicial de organismos por repetição	10
Temperatura	18 °C a 22 °C. Obs.: Outras temperaturas têm sido sugeridas para condições tropicais (ver capítulo 9).
Fotoperíodo	16 horas luz: 8 horas escuro (ABNT, 2012)
Intensidade de luz	400 a 800 lux.
Efeito observado	Alteração no número de juvenis em relação ao controle
Expressão dos resultados	CE50 em 42 dias para <i>E. albidus</i> ; 28 dias para espécies de <i>Enchytraeus</i> de ciclo de vida mais curto (21 dias em alguns casos; ver seção 12.3.4). Além de: tóxico ou não tóxico.
Crítérios de validade	Coefficiente de variação < 50%.
Substância de referência	Ácido bórico: 400 a 600 H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> kg <sup>-1</sup> de solo artificial OCDE (massa seca); valores para SAT discutidos na seção 12.3.6. Carbendazim: em desuso.

**Tabela 12.3.** Resumo do cronograma de execução do ensaio de reprodução com *E. crypticus* e *E. albidus*.

<b>Etapas</b>	<b>Período</b>	<b><i>Enchytraeus crypticus</i></b>	<b><i>Enchytraeus albidus</i></b>
Preparo do material	Dia 1	- Preparação do substrato (ver capítulo 7 e seção 11.3.3).	- Preparação do substrato (ver capítulo 7 e seção 11.3.3).
	Dia 3	- Determinação do pH do substrato (ver seção 7.5). - Determinação da CRA (ver seção 7.4).	- Determinação do pH do substrato (ver seção 7.5). - Determinação da CRA (ver seção 7.4).
	Dia 4-6	- Seleção de organismos para aclimação (ver seção 11.3.1).	- Seleção de organismos para aclimação (ver seção 11.3.1).
	Dia 7	- Pré-umedecimento do substrato e separação em lotes (ver seção 11.3.3).	- Pré-umedecimento do substrato e separação em lotes (ver seção 11.3.3).
Montagem do ensaio	Dia 8	- Preparação da solução estoque. - Aplicação da substância-teste (ver capítulo 8 e seção 11.3.4). - Pesagem do substrato-teste nos recipientes-teste. - Adição de alimento no substrato-teste. - Introdução dos organismos (ver seções 11.3.1 e 11.3.3). - Determinação do pH (ver seção 7.5) e pesagem.	- Preparação da solução estoque. - Aplicação da substância-teste (ver capítulo 8 e seção 11.3.4). - Pesagem do substrato-teste nos recipientes-teste. - Adição de alimento no substrato-teste. - Introdução dos organismos (ver seções 11.3.1 e 11.3.3). - Determinação do pH (ver seção 7.5) e pesagem.
	Dia 15	- Verificação da umidade e alimento.	- Verificação da umidade e alimento.
Ensaio preliminar e definitivo - Monitoramento e avaliações	Dia 22	- Determinação da mortalidade, remoção dos adultos e observação do comportamento (etapa facultativa do ensaio definitivo). - Verificação de umidade e alimento. - Ensaio preliminar se encerra aqui com: • Estimativa do número de juvenis. • Fixação e coloração dos juvenis (ver seção 12.3.5). • Determinação do pH (ver seção 7.5) e umidade.	- Verificação da umidade e alimento. - Ensaio preliminar se encerra aqui com: • Estimativa do número de juvenis. • Fixação e coloração dos juvenis (ver seção 12.3.5). • Determinação do pH (ver seção 7.5) e umidade.
	Dia 29	- Verificação de umidade e alimento.	- Determinação da mortalidade, remoção dos adultos e observação do comportamento. - Verificar umidade e alimento.
	Dia 36	- Fixação e coloração dos juvenis (ver seção 12.3.5). - Determinação do pH (ver seção 7.5) e umidade.	- Verificação da umidade.
	Dia 43		- Verificação da umidade e alimento.
	Dia 44		- Fixação e coloração dos juvenis (ver seção 12.3.5). - Determinação do pH (ver seção 7.5) e umidade.

### 12.3.8 Validação do ensaio de reprodução *Enchytraeus* sp.

Para que o ensaio de reprodução com enquitreídeos seja considerado válido, as normas NBR ISO 16387 (ABNT, 2012) e OECD 220 (OECD, 2004b) recomendam que três critérios sejam preenchidos. Esses critérios se aplicam aos dados de sobrevivência e reprodução nos controles:

1. A mortalidade dos adultos parentais (dez em cada recipiente-teste) não deve exceder 20% em média ao final do teste definitivo.
2. O número de juvenis ao final do teste definitivo em cada recipiente-controle deve ser maior que 25 (*E. albidus* – 42 dias) ou 50 (*E. crypticus* e outros

*Enchytraeus* de tamanho menor - 28 dias); o número mínimo poderia ser modificado para  $\geq 100$ , conforme dados mais recentes discutidos a seguir.

3. O coeficiente de variação calculado para os dados de reprodução (número de juvenis) ao final do teste deve ser menor que 50% no ensaio definitivo.

O critério para o número de juvenis recomendados pelas normas NBR ISO 16387 (ABNT, 2012) e OECD 220 (OECD, 2004b) é bastante baixo em relação à quantidade de juvenis produzidos em determinadas condições. Achazi (1997) relata o número de 104 juvenis produzidos por adulto em 28 dias em solo natural padrão LUFA 2.2 a 20 °C, enquanto Kuperman et al. (2006), relataram 480 juvenis por 10 adultos em solo artificial OECD. Kuperman et al. (2006), após compararem o efeito de vários tipos de solos americanos sobre a reprodução de *E. crypticus*, propõem que, para essa espécie, o critério de mortalidade aceitável seja mantido em 20%, mas que o número mínimo de juvenis por recipiente-controle seja modificado para 100 em 28 dias e o coeficiente de variação seja de no máximo 30%. Chelinho et al. (2011) também verificaram taxas reprodutivas bastante altas para *E. crypticus* em vários tipos de solo mediterrâneos (382-1.200 juvenis por recipiente a 20 °C em 28 dias) que também justificam um valor maior para o critério de número de juvenis para essa espécie. Castro-Ferreira et al. (2012) relataram mais de 700 juvenis após 21 dias em solo natural LUFA. A experiência dos autores desse capítulo mostrou que *E. crypticus* em SAT a 22 °C ou 25 °C apresenta taxa reprodutiva de mais de 1.000 juvenis por recipiente após 28 dias de incubação (Comunicação fornecida por Cintia Niva e Júlia Niemeyer em julho de 2013) e 400-700 juvenis após 21 dias a 22 °C ou 25 °C com *E. crypticus* ou outra espécie de *Enchytraeus* em SAT (Assis, 2015; de Menezes Oliveira et al., 2018; Oliveira-Filho et al., 2018; Niemeyer et al., 2018).

## 12.4 Cálculo e expressão dos resultados do ensaio de reprodução

Nos ensaios de reprodução com minhocas e enquitreídeos, a percentagem de mortalidade, redução/aumento de biomassa corporal (apenas para minhocas) e o número de juvenis produzidos no ensaio definitivo devem ser calculados e comparados por métodos estatísticos adequados (ver capítulos 10 e 14).

A maior concentração da substância testada que não causou alterações significativas na biomassa e na reprodução (CENO) e a menor que causou alterações (CEO) devem ser expressas em miligramas da substância por quilograma de solo seco ( $\text{mg kg}^{-1}$ ). A CENO e CEO são identificadas por análises de variância (ANOVA) e testes de comparações múltiplas (ver capítulo 14).

O valor de CEx do ensaio de reprodução, onde x pode ser a percentagem de 10, 20 ou 50, é a concentração estimada que causa efeito no número de juvenis produzidos em relação ao controle. Por exemplo, CE50 é a concentração que causa 50% de redução no número de juvenis produzidos em relação ao con-

trole. A concentração estimada é calculada através de uma análise de regressão não linear, com as médias obtidas de número de juvenis de cada tratamento. O CEx é obtido a partir do valor correspondente a X% da média do controle na equação da análise de regressão.

## Referências

- 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. 2012. 29 p.
- ACHAZI, R. K. Einfluss von anthropogenen Schadstoffen (PAK und PCB) auf terrestrische invertebraten urbaner Ökosysteme. In: KRATZ, W.; BROSE, A. (Ed.). **Bodenökologische Untersuchungen zur Wirkung und Verteilung von organischen Stoffgruppen (PAK, PCB) in ballungsraumtypischen Ökosystemen**. München: Abschlussbericht für das BMBF, 1997. p. 109-120.
- ALVES, P. R. L.; CARDOSO, E. J. B. N.; MARTINES, 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.
- Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº 114, de 19 de dezembro de 2007**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/scriptsweb/consulta\\_publica/consultas\\_paginado.asp?ano=2007](http://www.anvisa.gov.br/scriptsweb/consulta_publica/consultas_paginado.asp?ano=2007)>. Acesso em: 22 fev. 2019.
- ASSIS, O. **Enquitreídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta) como indicadores do manejo do solo e em ensaios ecotoxicológicos**. 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba.
- ASTM. American Society for Testing and Materials. **E1676**: 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. 26 p.
- BECKER, L.; SCHEFFCZYK, A.; FÖRSTER, B.; OEHLMANN, J.; PRINCZ, J.; RÖMBKE, J.; MOSER, T. Effects of boric acid on various microbes, plants, and soil invertebrates. **Journal of Soils and Sediments**, v. 11, p. 238-248, 2011. 10.1007/s11368-010-0282-7.
- 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. 54, S19-S25, DOI: 10.1016/j.pedobi.2011.07.007.
- 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.
- 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.
- CARDOSO, E.J.B.N.; ALVES, P.R.L.A. Soil Ecotoxicology. In: BEGUM, G. (Org.). **Ecotoxicology**. 1ed. InTech, 2012, p. 27-50.
- 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.

Canada. Environment Canada. Environmental Technology Centre. **Biological test method: test for toxicity of contaminated soil to earthworms (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*)**. Ottawa, 2004. 156 p.

HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A.; CAIRNS J. **Handbook of Ecotoxicology**. London: Blackwell Scientific Publications, 2003. v. 2. 1290 p.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 11268:-2: soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*): part 2: determination of effects on reproduction**. Geneve, 2012.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 16387: soil quality: effects of contaminants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determination of effects on reproduction**. Geneve, 2014.

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.

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.

MORAIS, R. S.; ASSIS, O.; NIVA, C. C.; OLIVEIRA, V.B. M.; BIANCHI, M. O.; BROWN, G. G. Ensaio de reprodução de duas espécies de enquitreídeos utilizando ácido bórico como substância de referência. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 14., 2016, Curitiba. **Anais de resumos**. [S.l.]: Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia, 2016. p. 1812-1813.

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, p. 395-401, 2018. DOI: 10.1007/s10646-018-1915-7.

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

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; BRITO, D. Q.; DIAS, ZELIA M. B.; GUARIEIRO, M. S.; CARVALHO, E. L.; FASCINELI, M. L.; NIVA, C. C.; GRISOLIA, C. K. Effects of ashes from a Brazilian savanna wildfire on water, soil and biota: an ecotoxicological approach. **Science of the Total Environment**, v. 618, p. 101-111, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.051.

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida/andrei*)**. Paris, 2004a. 18 p. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 222).

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Enchytraeidae reproduction test**. Paris, 2004b. 22 p. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 220).

RIDA, A. M. M. A.; BOUCHÉ, M. B. Earthworm toxicology: from acute to chronic tests. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, n. 3/4, p. 699-703, 1997. DOI: 10.1016/S0038-0717(96)00275-1.

RÖMBKE, J.; MOSER, T. **Organisation and performance of an international ringtest for the validation of the enchytraeid reproduction test.** [S.l.: s.n.], 1999. v. 1, 2. 223 p. (UBA-Texte 4/99).

RÖMBKE, J.; GARCIA, M. V. B.; SCHEFFCZYK, A. Effects of the fungicide benomyl on earthworms in laboratory tests under tropical and temperate conditions. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 590-598, 2007. DOI: 10.1007/s00244-006-0219-8.

STANTEC. **Developmental studies in support of environment Canada's biological test methods for measuring soil toxicity to earthworms.** Ottawa: Environmental Technology Centre, 2004.