

RESPOSTAS DE *EISENIA ANDREI* (BOUCHÉ 1972) AO EXCESSO DE COBRE EM UM SOLO ARENOSO

Liriane Élen Böck*; Angélica Guimarães da Silva*; Giulia Zago de Oliveira Azzolin*; André Azevedo Machado*; Henrique Ferreira da Costa*; Natíelo Almeida Santana**; Andressa de Oliveira Silveira***

*Graduando em Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Maria

**Pós-Doutorando no Programa de Engenharia Ambiental-UFSM.

*** Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental e Professora Adjunta do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental na Universidade Federal de Santa Maria

*Autor para correspondência e-mail: natielo_sm@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE

Contaminação
Minhocas
Teste Agudo
Teste de Fuga
Ecotoxicologia

KEYWORDS

Contamination
Earthworm
Acute Test
Avoidance Test
Ecotoxicology

RESUMO

O cobre em excesso no solo provoca graves problemas ambientais. Este problema é maior quando o solo apresenta textura arenosa o que favorece a disponibilidade do metal aumentando os riscos aos organismos do solo. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito toxicológico do cobre em minhocas da espécie *Eisenia andrei* em um solo arenoso. Um solo arenoso foi coletado e adicionado de quatro doses de cobre na forma de sulfato de cobre, 0, 60, 120 e 240 mg Cu kg⁻¹. Este solo foi utilizado para a realização de um teste de fuga e um teste agudo utilizando minhocas da espécie *Eisenia andrei*. Foi determinada a porcentagem de fuga, o incremento médio de peso, biomassa e a sobrevivência dos indivíduos. A presença do cobre em excesso resultou em toxidez ao organismo das minhocas. No solo contaminado com cobre houve elevado evitamento das minhocas, com maior porcentagem para as doses de 120 e 240 mg kg⁻¹ de cobre. O período de exposição ao contaminantes não resultou em perda ou incremento de peso. A presença do cobre, principalmente nas doses altas, resultou na redução da biomassa de *Eisenia andrei*.

ABSTRACT

EISENIA ANDREI (BOUCHÉ 1972) RESPONSES TO COPPER EXCESS IN A SANDY SOIL

The soil copper excess causes serious environmental problems. This problem is greater when the soil has a sandy texture which favors the metal availability and increases the risks to the soil organisms. The aim of this study was to evaluate the toxicological effect of copper on *Eisenia andrei* earthworms in a sandy soil. A sandy soil was collected and added with four levels of copper in the form of copper sulfate, 0, 60, 120 and 240 mg Cu kg⁻¹. This soil was used for an avoidance test and an acute ecotoxicological test using *Eisenia andrei* earthworms. The percentage of avoidance, the average increase in weight, biomass and survival of the individuals were determined. The copper excess resulted in toxicity to the earthworm organism. In the copper contaminated soil there was high avoidance of earthworms, with higher percentage for the doses of 120 and 240 mg kg⁻¹ of copper. The period of exposure to contaminants did not result in loss or increase of weight. The presence of copper, especially at high doses, resulted in a reduction in *Eisenia andrei* biomass.

Recebido em: 12/09/2019

Aprovação final em: 05/12/2019

DOI:10.25061/2527-2675/ReBraM/2020.v23i1.792

INTRODUÇÃO

Diversas substâncias com potencial contaminante são lançadas diariamente no meio ambiente, com pouco ou nenhum conhecimento sobre suas consequências no ecossistema. Devido a este fato, surgiram diversos estudos, ciências e ensaios normatizados que visam compreender os efeitos destes agentes químicos sobre os organismos. A ecotoxicologia é uma ciência que possui como base avaliar os efeitos tóxicos de substâncias no ecossistema (TEIXEIRA, 2016).

Os testes toxicológicos são métodos empregados para avaliar e identificar a capacidade que algumas substâncias têm de causar efeitos deletérios nos seres vivos (RODRIGUES et al., 2003). Os efeitos causados são analisados e quantificados a partir da exposição dos organismos-teste a diferentes concentrações de xenobióticos (COSTA et al., 2008). Segundo Duan et al (2016) os dados obtidos em estudos ecotoxicológicos são de grande importância para a avaliação de riscos e critérios de qualidade ambiental para contaminantes principalmente os metais pesados.

Existem estudos sobre muitas substâncias e elementos químicos que são potenciais contaminantes ambientais, um exemplo é o cobre (Cu). Segundo Azevedo e Chasin (2003), ele é encontrado no meio ambiente em formas naturais e pode se apresentar em diferentes compostos químicos. Por estar presente em diversos produtos, o cobre ocasiona grande contaminação quando apresenta-se em altas concentrações nos ecossistemas, o que causa toxicidade para os indivíduos (POHANKA et al., 2019). Os efeitos decorrentes da contaminação podem ser letais e subletais aos organismos, como dificuldades na reprodução, alterações em suas funções, crescimento, desenvolvimento, comportamento, alterações nas atividades enzimáticas e morte (ANDREA, 2008). As minhocas são organismos que habitam o solo e são frequentemente utilizados em testes de toxicidade pois são sensíveis a modificações no ambiente principalmente às contaminações por metais pesados (MABOETA; FOUCHÉ, 2014).

Diversos solos, principalmente os agrícolas encontra-se contaminados com cobre. Algumas atividades como a mineração, a fundição, a incineração de resíduos, queima de carvão para fonte de energia, curtumes, lançamentos de efluentes, aplicação de fungicidas cúpricos e adubação com dejetos de suínos causam o aumento do teor de cobre no meio ambiente, que por consequência provoca efeitos deletérios em muitos dos organismos que ali habitam (BRUNETTO et al., 2014; FORMENTINI et al., 2015; SANTANA et al., 2019). Os riscos da contaminação por cobre são ainda maiores em solos de textura arenosa, devido ao baixo teor de argila e matéria orgânica o que resulta em baixa capacidade de troca de cátions fazendo com que a maior parte do cobre adicionado ao solo resulte em formas disponíveis aos organismos (BRUNETTO et al., 2014).

O cobre é essencial para os organismos participando de diversos processos metabólicos, porém quando em excesso provoca toxidez. Em vista disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do cobre na sobrevivência e reprodução de minhocas da espécie *Eisenia andrei* em um solo arenoso.

MATERIAL E MÉTODOS

SOLO E ORGANISMO TESTE

Os ensaios ecotoxicológicos em laboratório. Procedeu-se os testes de fuga e de toxicidade aguda utilizando a minhoca da espécie *Eisenia andrei*. O contaminante utilizado foi o cobre (Cu).

O solo utilizado foi um Argissolo de textura arenosa com as seguintes características: pH em água (1:1) 5,3; Índice SMP 6,3; Saturação por bases 63,1%; Matéria orgânica 18 g kg⁻¹; Areia 720 g dm⁻³, Silte 140 g dm⁻³, Argila 140 g dm⁻³; P (Melich-1) 17,1 mg dm⁻³; K (Melich-1) 92 mg dm⁻³; H+Al 3,1 cmol_c dm⁻³; Ca trocável 3,6 cmol_c dm⁻³; Mg trocável 1,5 cmol_c dm⁻³.

TESTE DE FUGA

Tomou-se como referência para o ensaio a ISO 17512-1 que dispõe sobre a Qualidade do solo - Ensaio de fuga- para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento das minhocas com algumas modificações.

O teste de fuga consiste em expor as minhocas simultaneamente a um solo teste e a um solo controle. Neste, foram analisadas três concentrações de cobre com quatro repetições (60, 120 e 240 mg Cu Kg⁻¹ de solo). O cobre foi adicionado usando sulfato de cobre (CuSO₄·5H₂O), resultando em uma contaminação igual e duas acima dos valores de prevenção (> 60,0 mg kg⁻¹ Cu) de acordo com a legislação brasileira (CONAMA, 2009).

Cada recipiente com capacidade para um litro foi dividido ao meio com uma tira de papelão, inserindo de cada lado 350 g de solo teste com suas respectivas concentrações e 350 g de solo controle umedecido com água destilada. A umidade do solo foi corrigida para 60%. A seguir, retirou-se as tiras de papelão, onde os solos entraram em contato, foram inseridas 10 minhocas adultas. Os recipientes foram fechados com tampa de coloração escura e perfuradas para que houvesse a entrada de oxigênio. Os recipientes foram mantidos a uma temperatura de ~25° C por 48 horas. Após 48 horas, a tira de papelão foi introduzida novamente em cada recipiente com o objetivo de contar o número de indivíduos que permaneceram em cada solo (controle e tratamento) a fim de determinar a porcentagem de fuga dos animais.

TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

Para o teste agudo, tomou-se como base a orientação da Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) - Guia para testes químicos n° 207 (OECD-1984) com algumas modificações. Foi utilizado solo natural ao invés de substrato artificial.

As doses foram as mesmas utilizadas para o teste de fuga (60, 120 e 240 mg Cu kg⁻¹) além de um tratamento somente com solo (0 mg Cu kg⁻¹), com três repetições. A umidade do solo foi mantida em 60% da sua capacidade de campo. Em cada repetição foram inseridas 10 minhocas previamente lavadas e pesadas.

Os recipientes foram mantidos fechados, em temperatura constante de ~20°C e em local com pouca luminosidade. No período de teste as minhocas foram alimentadas com 15 g de esterco bovino uma vez a cada 7 dias. Foram realizadas pesagens no dia inicial, 7°, 14°, 21° e 28° dias após o início do experimento para avaliar a ocorrência de ganho ou perda de peso e número de indivíduos.

ANÁLISE DOS DADOS

A partir dos dados obtidos foram calculadas as médias, desvio padrão e análise de variância seguida pelo teste *Tukey* com $p < 0,05$ e regressão com $p < 0,05$. Para os dados de fuga foi calculado a porcentagem de resposta de fuga conforme a seguinte equação:

$$RF = [(C-T)/N] * 100$$

Onde *RF* é a resposta de fuga (%); *C* é o número de minhocas no solo de controle; *T* é o número de minhocas no solo contaminado; *N* é o número total de minhocas por réplica. Um *RF* positivo (+) indica evitação e um *RF* negativo (-) indica uma não resposta ao contaminante.

Os dados de peso dos indivíduos do teste de toxicidade aguda foram utilizados para o cálculo de incremento médio de peso obtido pela seguinte equação:

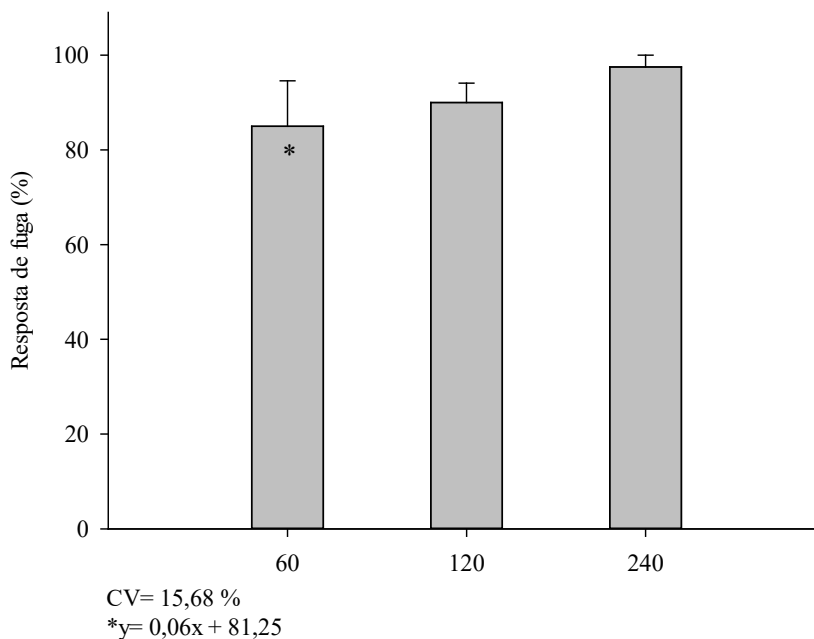
$$\text{Incremento (\%)} = [(C-T)/N] * 100$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição das doses crescentes de cobre no solo arenoso resultou em aumento linear na porcentagem

de fuga de *E. andrei* (Figura 1). A presença do cobre em excesso provocou toxicidade no organismo das minhocas (% fuga > 80%) em todas as doses testadas (Figura 1). A evitação da minhoca foi considerada alta somente nas duas doses maiores (acima de 87%) conforme relatado por Oladipo et al (2019). A dose de 240 mg kg⁻¹ de cobre provocou a fuga média de 97,5% do total de indivíduos o que demonstra extrema toxicidade pelo sulfato de cobre. A menor dose foi a menos prejudicial, mas apresentando elevada toxicidade (85%). Mesmo em concentrações baixas de contaminantes podem ocorrer respostas comportamentais nas minhocas (SIVAKUMAR, 2015).

Figura 1 - Porcentagem de resposta de fuga de *E. Andrei* em solo arenoso contaminado com cobre. * significativo com $p < 0,05$.



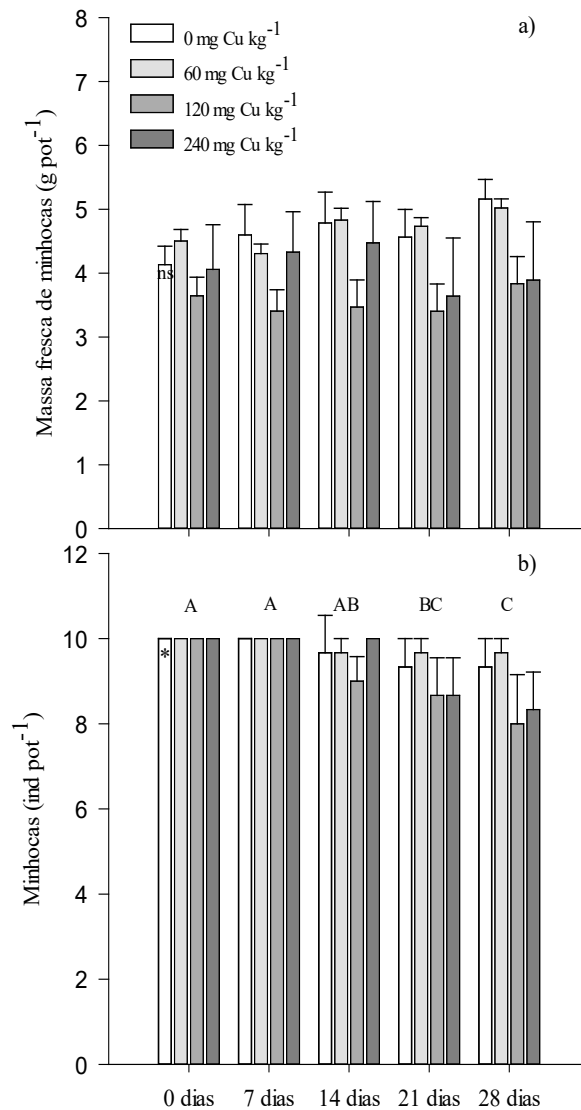
Fontes: Elaborado pelos autores, 2019.

As minhocas apresentaram grande sensibilidade ao cobre, segundo Reinecke et al (2002), esse comportamento ocorre devido à presença de tubérculos sensoriais e quimiorreceptores em toda a extensão de seu corpo. Somado a isso, o sulfato de cobre provoca elevada repelência das minhocas sendo a fuga considerada a primeira resposta sensorial das minhocas (DEMUYNCK et al., 2016). A evitação das minhocas é ocasionada devido ao excesso do metal, independente do sal utilizado na contaminação. Segundo Demuyneck et al (2016) além do efeito sensorial de repelência, o segundo mecanismo de efeito ao excesso de metais no ambiente das minhocas é o acúmulo de metal no intestino devido a atividade de alimentação das minhocas. No entanto, este efeito é verificado com maior amplitude em testes crônicos com maior tempo de exposição ao contaminante.

As doses crescentes de cobre resultaram em efeitos negativos ($p < 0,01$) ao organismo das minhocas verificado pelo teste de toxicidade aguda (Figura 1a e Figura 1b). Porém, os dias de exposição não apresentaram efeitos significativos ($p = 0,71$) no peso dos indivíduos. Ferreira (2015) verificou que o tempo de exposição não modificou o peso das minhocas visto que as mesmas eram alimentadas semanalmente

com esterco bovino o que promoveu pouca modificação na variação do seu peso em relação ao inicial ou até mesmo aumento significativo.

Figura 2 - Massa fresca (a) e número de minhocas (b) expostas às doses crescentes de cobre em 28 dias de exposição. ns: não significativo com $p < 0,05$ para o efeito dos dias de exposição no peso das minhocas. * significativo com $p < 0,05$ para o efeito dos dias de exposição na mortalidade das minhocas. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula **não são** significativas para efeito dos dias de exposição na mortalidade das minhocas pelo teste *Tukey* com $p < 0,05$.



Fontes: Elaborado pelos autores, 2019.

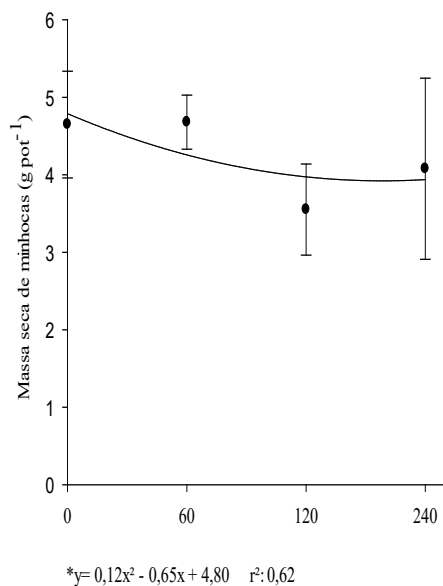
Houve mortalidade de indivíduos durante a condução do experimento (Figura 1b). Após os 14 dias de exposição ao cobre houve redução média de 10% em relação à população inicial nas maiores doses de cobre (120 e 240 mg Cu kg⁻¹). Nas maiores concentrações de cobre obteve-se o maior número de mortes até o 28°

dia, indicando a toxicidade do xenobiótico às minhocas. A presença de cobre em excesso no solo resulta no acúmulo pela minhoca resultando em diversos efeitos fisiológicos como estresse oxidativo, peroxidação lipídica e neurotoxicidade (ZHOU et al., 2013). Segundo Arboit et al (2016) em altas concentrações de cobre e outros metais, ocorre desequilíbrio entre absorção e excreção pelas minhocas, provocando toxicidade aos organismos resultando na sua morte (ARBOIT et al., 2016). No tratamento sem adição de cobre também houve mortes de indivíduos, porém em menor proporção, efeito atribuído ao estresse ocasionado pela limpeza e pesagem das mesmas durante o ensaio.

A toxidez do cobre no organismo da minhoca depende do teor do metal disponível no solo. Solos com textura mais arenosa apresentam potencial contaminante maior do que observado em solos argilosos devido ao menor teor de matéria orgânica, menor porcentagem de argilas óxidos e reduzida CTC o que resulta em alta biodisponibilidade do cobre (Brunetto et al., 2014). Segundo Sivakumar et al (2015) o efeito maléfico do cobre na minhoca depende da concentração disponível do metal no solo o que reflete em maior contato dérmico e ingestão. Segundo os autores a adsorção de metais à superfície externa da minhoca é facilitada pela secreção do muco epidérmico produzido pelas glândulas de muco e por secreções liberadas por nefridióporos responsáveis pela manutenção da umidade da pele das minhocas.

A adição do cobre no solo arenoso resultou na redução significativa da massa seca dos indivíduos de *E. andrei* (Figura 3). No entanto, o aumento de peso das minhocas na concentração de 60 mg Cu.Kg⁻¹ solo após o 7º dia pode ser explicado devido à adaptação das mesmas ao contaminante. Além disso, deve ser considerado que houve morte de organismos (Figura 3) e, ainda assim, houve aumento de peso das sobreviventes.

Figura 3 - Efeito isolado das doses crescentes de cobre na massa fresca de *Eisenia andrei*. * significativo com $p > 0,05$.



Fontes: Elaborado pelos autores, 2019.

As minhocas são capazes de absorver e excretar metais até uma determinada concentração. As minhocas toleram grande quantidade de metais pesados no solo e podem modificar as formas do elemento e acumulá-los em seu próprio corpo (IORDACHE; BORZA, 2012). O acúmulo do cobre no tecido das minhocas

aumenta de acordo com os níveis em que o metal se encontra no solo (DU et al., 2014). No entanto, para González-Alcaraz e Van Gestel (2016) as minhocas podem controlar a absorção dos metais através da redução na captação, ou seja, o organismo absorve o metal até certo limite e após cessa o seu acúmulo. Além disso, segundo os autores a minhoca tem a capacidade de armazenar o metal em formas não lábeis ou promover sua rápida excreção o que se configura como um mecanismo de tolerância à certas doses.

A partir da dose 60 mg Cu kg⁻¹ houve grande redução do peso médio de indivíduos (Figura 3). É possível constatar que às maiores concentrações de cobre ocasionaram a maior redução de peso e mortalidade das minhocas. Em conformidade com Arboit et al (2016), a perda de peso nas concentrações mais altas pode indicar efeito sub-letal, sendo isto uma prerrogativa para levar à redução na densidade populacional de *E. andrei*. Para Ribeiro et al (2012), *E. andrei* é bastante sensível ao cobre.

O incremento ou decréscimo de peso nas doses 0, 60, 120 e 240 mg Cu.Kg⁻¹ solo foi observado como sendo de 10,14%, 8,87%, -0,07% e -94,83%, respectivamente. Deve-se ressaltar também, que as repetições com solo controle e com a menor concentração testada apresentaram maior número de indivíduos juvenis e casulos ao longo do ensaio do que as demais concentrações (dados não apresentados). Segundo Reinecke e Maboeta (2001) doses elevadas de metais causam efeitos maléficis no sistema reprodutivos de várias espécies de minhocas, prejudica a fertilização, o desenvolvimento embrionário e a produção de gametas, o que pode levar a diminuição da produção de casulos e a diminuição do número de filhotes por casulos. É válido salientar que durante a última semana as minhocas do solo contendo maior concentração de cobre não se alimentaram, sendo esta uma resposta clara à contaminação.

CONCLUSÃO

O alto teor de cobre no solo arenoso provoca efeito tóxico para o organismo de *Eisenia andrei*. A adição de 120 e 240 mg Cu kg⁻¹ de cobre no solo provoca alta porcentagem de fuga da minhoca. As minhocas não reduzem a biomassa ao longo do período de exposição ao contaminante. No entanto, as dosagens mais altas de cobre (120 e 240 mg Cu kg⁻¹) provocam redução do peso corporal de *E. Andrei*.

REFERÊNCIAS

ANDREA, M. M. **Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos**. 2008. Disponível em:<http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/Bioindicadores/Index.htm>. Acesso em: 18 jul. 2019.

ARBOIT, J. P. C. et al. Respostas ecotoxicológicas de *Eisenia andrei* expostas ao cobre. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 24., 2016, Ijuí. **Anais...**Ijuí: Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, 2016.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **Metais: Gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Atheneu, 2003.

BRUNETTO, G. et al. Mobility of copper and zinc fractions in fungicide amended vineyard sandy soils. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 60, n. 5, p. 609–624, mai 2014.

BUCH, A.C.; SAUTER, K.D.; BROWN, G.G. Minhocas nativas em teste ecotoxicológicos. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE ECOLOGIA E TAXONOMIA DE OLIGOQUETAS (ELAETAO4), 4., 2010, Curitiba/PR. **Anais...** Curitiba/PR: Embrapa Florestal, 2010.

CETESB. Ficha De Informação Toxicológica. **Cobre**. São Paulo, 2012. Disponível em:<www.cetesb.org.br>.

sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/cobre.pdf >. Acesso em: 16 jun. 2019.

COSTA, C. R.; et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n7/v31n7a38.pdf>>. Acesso em: 07 jun. 2019.

DEMUYNCK, S. et al. Comparative avoidance behaviour of the earthworm *Eisenia fetida* towards chloride, nitrate and sulphate salts of Cd, Cu and Zn using filter paper and extruded water agar gels as exposure media. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 129, p. 66-74, jul. 2016.

DUAN, X. et al. Effects of soil properties on copper toxicity to earthworm *Eisenia fetida* in 15 Chinese soils. **Chemosphere**, v. 145, p. 185-192, fev. 2016.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 17512-1: Soil quality - Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour - Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*)**. Switzerland, Geneva, 2008.

IODACHE, M.; BORZA, I. O potencial de biorremediação de minhocas (Oligochaeta: Lumbricidae) em um solo poluído por metais pesados. **J. Food Agri. Env.**, v.10, 1183-86, 2012.

FERREIRA, T. **Biomarcadores enzimáticos e ecotoxicidade por cobre em *Eisenia andrei* (Bouché 1972)**. 2015. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo)–Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, 2015.

FORMENTINI, T. A. et al. Copper and zinc accumulation and fractionation in a clayey Hapludox soil subject to long term pig slurry application. **Science of The Total Environment**, v. 536, p. 831-839, dez. 2015.

GONZALEZ-ALCARAZ, M.N; VAN GESTEL, C.A.M. Bioacumulação metal/metalóide(As,Cde Zn) na minhoca *Eisenia Andrei* sob diferentes cenários de mudanças climáticas. **Poluição ambiental**, v. 215, p. 178-86, 2016.

LUKKARI, T.; Et al. Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworm tests. **Applied Soil Ecology**, [S. I.] v. 30, n. 2, p. 133-146, 2005.

MABOETA, M.; FOUCHÉ, T. Utilizing an Earthworm Bioassay (*Eisenia andrei*) to Assess a South African Soil Screening Value with Regards to Effects from a Copper Manufacturing Industry. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [S. I.], v. 93, n. 3, p. 322-326, 2014.

MESTRINHO, C.C. **Toxicidade aguda e rejeição ao fungicida oxicloreto de cobre para *Eisenia fetida* e *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta)**. 2009.76 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical)–Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. N° 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests, Guideline for Testing of Chemicals, Paris, 1984. 9 p.

POHANKA, M. Copper and copper nanoparticles toxicity and their impact on basic functions in the body. **Bratislavske lekarske listy**, v. 120, n. 6, p. 397, 2019.

REINECKE, A. J.; et al. Assessment of Lead Nitrate and Mancozeb Toxicity in Earthworms Using the Avoidance Response. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 68, p. 779-786, 2002.

REINECKE, A. J.; REINECKE, S. A.; MABOETA, M. S. Cocoon production and viability as endpoints in toxicity testing of heavy metals with three earthworm species. **Pedobiologia**, [S.I.], v. 45, n. 1, p. 61-68, 2001.

RIBEIRO, R.; et al. A absorção de cobre por minhocas da espécie *Eisenia andrei* em solos e húmus contaminados. **Destaques Acadêmicos**, Lajeado/RS, v. 4, n. 4, 2012.

RIBEIRO, L. V.; SCHIEDECK, G.; ROCHA, M. P. Evitamento de minhocas *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) a Substratos tratados com Calda Bordalesa. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 21.2012, Pelotas/RS. **Anais...** Pelotas/RS: Universidade Federal de Pelotas, 2013.

RODRIGUES, L. H. R.; et al. Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* (Chlorococcales, Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de ensaios de toxicidade crônica. **Biociências**, Porto Alegre/RS, v. 11, n. 2, p. 137-144, dez. 2003. Disponível em:<<https://www.ufrgs.br/ecotox/wp-content/uploads/PDF/Rodrigues-et-al-2003.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2019.

SANTANA, N. A. FERREIRA, P. A. A.; TAROUCO, C. P.; SCHARDONG, I. S.; ANTONIOLLI, Z. I. ; NICOLOSO, F. T. ; JACQUES, R.J.S. Earthworms and mycorrhization increase copper phytoextraction by *Canavalia ensiformis* in sandy soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, n. 109383, p.1-11, 2019.<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019>.

SIVAKUMAR, S. Effects of metals on earthworm life cycles: a review. **Environ. Monit. Assess.**, 2015, v.187, n.8, p. 530.

SPADOTTO, C. A.; et al. **Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos**: princípios e recomendações. Jaguariúna/SP: Embrapa Meio Ambiente, 2004. Disponível em:<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPMA/5810/1/documentos_42.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2019.

TEIXEIRA, A. G. **Toxicologia**. Londrina/PR: Editora e Distribuidora Educacional S.A., 2016.

ZHOU, C. F. et al. Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (*Eisenia fetida*). **Environmental Pollution**, v. 180, p. 71-77, set. 2013.