

Toxicidade do cobre em função da correção do pH em dois solos naturais – Uma abordagem com plantas e organismos edáficos

Copper toxicity assessment in two soil natural with different pH bands - An approach to edaphic plants and organisms

Talyta Zortéa¹; Manuela Testa¹; Antônio Waldimir Leopoldino da Silva ²; Dilmir Baretta*²

¹ Mestranda; Departamento de Zootecnia; Universidade do Estado de Santa Catarina.

² Professor adjunto; Departamento de Zootecnia; Universidade do Estado de Santa Catarina; dilmir.baretta@udesc.br

Artigo enviado em 03/07/2016, aceito em 19/09/2016 e publicado em 13/10/2016.

Resumo - O crescente desenvolvimento agrícola tem resultado em problemas ambientais decorrentes da geração de resíduos contendo elementos tóxicos e algumas práticas agrícolas inadequadas podem desencadear o acúmulo de cobre (Cu) no solo. O objetivo do trabalho é avaliar os efeitos da calagem na toxicidade do Cu, sobre a germinação de plantas e na biota do solo. Foram realizados testes ecotoxicológicos de germinação de sementes, as quais foram utilizadas as espécies *Avena sativa* e *Vicia villosa*, e teste de fuga com organismos teste da espécie *Enchytraeus crypticus*, ambos os ensaios foram realizados em Latossolo Vermelho distrófico (LVd) e Neossolo Quartzarênico órtico típico (RQo). Os tratamentos consistiram em doses crescentes de sulfato de cobre (CuSO₄), sendo 0; 10, 40, 80, 160 e 320 mg kg⁻¹, em solo com pH corrigido e não corrigido. A exposição de sementes de *A. sativa* e *V. villosa* a doses crescentes de CuSO₄ não expressou efeito tóxico na taxa de germinação (P>0,05), em ambos os solos, independente da correção do pH. Foi observado fuga significativa para o LVd, já na primeira dose avaliada e para o RQo também foi observada fuga significativa, no entanto, com variação das doses de acordo com a correção do pH. Deste modo a contaminação de diferentes tipos de solos naturais com CuSO₄ não afeta a taxa de germinação das sementes *A. sativa* e *V. villosa*, mas para enquitreídeos *E. crypticus* houve fuga em ambos os solos avaliados (LVd e RQo), indicando que oligoquetas são capazes de detectar e evitar solos contaminados com Cu.

Palavras-chave - ecotoxicologia, produção animal, manejo do solo, metal pesado.

Abstract - The growing agricultural development has resulted in environmental problems of the generation of waste containing toxic elements and some inadequate agricultural practices can trigger copper (Cu) accumulation in the soil. The aim is to evaluate the effects of liming on copper toxicity, on the germination of plants and soil biota. Ecotoxicological tests of seed germination were performed, which were used species *Avena sativa* and *Vicia villosa*, and avoidance test organisms test species *Enchytraeus crypticus*, both tests were performed in Oxisol (LVd) and Entisol (RQo). The treatments consisted of increasing doses of copper sulfate (CuSO₄), and 0; 10, 40, 80, 160 and 320 mg kg⁻¹ in soil pH corrected and uncorrected. The seeds of exposure *A. sativa* and *V. villosa* to increasing doses of CuSO₄ expressed no toxic effect on the germination rate (P> 0.05) in both soils, regardless of pH correction. Significant avoidance was observed for LVd on the first dose and evaluated for significant avoidance RQo was also observed, however, with a range of doses according to the pH adjustment. Thus contamination of different types of natural soil with CuSO₄ does not affect seed germination rate *A. sativa* and *V. villosa*, but leakage was enchytraeids *E. crypticus* evaluated in both soils (LVD and RQo), indicating that earthworms are able to detect and prevent soil contaminated with Cu.

Keywords - ecotoxicology, animal production, soil management, heavy metal

INTRODUÇÃO

O cobre (Cu) é um micronutriente essencial e possui função relacionada ao crescimento das plantas, além de fazer parte estrutural de algumas enzimas (AN, 2005), no entanto, quando em quantidades elevadas no solo esse componente, considerado metal pesado, pode desencadear efeitos tóxicos tanto a plantas quanto a biota

do solo (LEQUEUX et al., 2010; CAMBROLLÉ et al., 2015).

O crescente desenvolvimento agrícola tem resultado em problemas ambientais decorrentes da geração de resíduos contendo elementos tóxicos (JORIS et al., 2012), a contaminação do solo por metais pesados é um problema ambiental bem conhecido, particularmente em regiões agrícolas abandonadas e áreas de minas (SACRISTÁN et al., 2016). Práticas agrícolas

inadequadas também podem levar a uma acumulação de Cu no solo (MCLAUGHLIN et al., 2000), decorrentes da utilização de corretivos, fertilizantes, defensivos e fungicidas a base de Cu na camada arável (TURRA et al., 2011), além disso, aplicações repetidas de dejetos de animais podem levar a uma acumulação de Cu (MCGRATH et al., 1982), uma vez que este elemento está incluído na dieta de suínos e aves, como um promotor de crescimento (CHANEY & OLIVER, 1996; RUYTERS et al., 2013).

Os metais pesados podem representar uma ameaça para a saúde humana, a contaminação atribuída a metais classificados como micronutrientes (por exemplo, Cu) é relevante, pois a taxa de absorção destes metais pelas plantas é ampla, apresentando variação no comportamento e na resposta a este tipo de elemento (KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 2001) atingindo concentrações elevadas. Por estas razões, o estabelecimento de padrões adequados de qualidade do solo é de grande interesse. Além disso, o excesso de Cu pode influenciar todas as fases do ciclo de vida da planta sendo que, a sensibilidade ao metal e a toxicidade dependem de estágios de desenvolvimento (LIU et al., 2005).

Além do desenvolvimento das plantas, quantidades excessivas de Cu podem afetar negativamente os organismos da fauna edáfica, que apresentam papel fundamental no equilíbrio do ecossistema (AMORIM et al., 2008). Destes organismos, as oligoquetas terrestres (filo Annelida) têm função importante ao nível de estrutura e função (van GESTEL et al., 2011). Os enquitreídeos regulam indiretamente a degradação da matéria orgânica e promovem um bom arejamento do solo, funções estas vitais para o ecossistema terrestre (AMORIM et al., 2005).

Uma forma de reduzir os efeitos de toxicidade do Cu é a realização da calagem, esta prática aumenta a capacidade de troca de cátions e o pH do solo (AGBENIN & OLOJO, 2004). Joris et al. (2012), verificaram que a calagem aumentou a adsorção de Cu principalmente nas camadas 0 a 10 cm de profundidade, isso se deve ao fato de o Cu possuir maior seletividade nas superfícies coloidais, resultando em alta energia de ligação e estabilidade pela formação de complexos com o elemento (SPARKS, 2003).

Os ensaios de ecotoxicidade devem ser realizados para aumentar o conhecimento sobre o efeito de Cu em solos agrícolas, avaliando o efeito das propriedades do solo sobre mobilidade e biodisponibilidade dos metais nas culturas e organismos edáficos. O objetivo do trabalho é avaliar os efeitos da calagem na toxicidade do cobre em dois tipos de solos, sobre a germinação de *Avena sativa* L. (gramínea) e *Vicia villosa* Roth (leguminosa) e de uma espécie de enquitreídeo (*Enchytraeus crypticus*).

MATERIAL E MÉTODOS

Parâmetros gerais dos testes

Foram realizados testes ecotoxicológicos de germinação de sementes, as quais foram utilizadas as espécies de gramínea aveia preta (*Avena sativa* L.) e leguminosa ervilhaca (*Vicia villosa* Roth) como representantes de uma lista de espécies cultivadas e recomendadas para testes ecotoxicológicos (OECD 208, 2006). Para o teste de fuga fora utilizados organismos testes da espécie de enquitreídeos *E. crypticus* (WESTHEIDE & GRAEFE, 1992).

Solos

Foram utilizados dois solos naturais representativos de áreas agrícolas, os quais eram classificados em sendo Latossolo Vermelho distrófico (LVd), que foi coletado no município de Chapecó (27°05'27" S e 052°38'08" W), e Neossolo Quartzarênico órtico típico (RQo), coletado no município de Araranguá (29°00'19.89" S e 49°31'02.84" W). Ambos não possuíam histórico de aplicação de fertilizantes e compostos químicos (herbicidas, fungicidas), após as áreas serem selecionadas foram coletadas amostras da camada superficial de (0 – 20 cm de profundidade). Os parâmetros físico-químicos do solo são apresentados na Tabela 1. Os solos foram secos em estufa e tamisados em peneira de malha 2 mm para homogeneização e separação de fragmentos vegetais, antes do início do ensaio os solos foram corrigidos para 70% da capacidade de campo.

Tabela 1 - Parâmetros químicos e físicos do Latossolo Vermelho distrófico* (LVd) e Neossolo Quartzarênico órtico típico* (RQo) avaliados na camada de 0-20 cm (Chemical and physical parameters of Oxisol and Entisol valuated at 0-20 cm).

	MO ¹	CTC ²	Argila	Areia	P	K	Ca	Mg	H+Al	Cu	Zn	Fe
	(%)		(%)		(mg dm ⁻³)		..(cmol _c dm ⁻³)..			..(mg dm ⁻³)..		
LVd	3,9	12,3	49	12	3,5	124	3,2	1,8	7,83	1,4	0,8	79,7
RQo	0,9	4,92	4	37	6,7	34	2	0,83	2	1,5	1	72,5

*Segundo o Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos (EMBRAPA, 2006)

¹MO – Matéria Orgânica.²CTC – Capacidade de Troca Catiônica em pH 7,0.

Tratamentos

Os tratamentos consistiam em doses crescentes de sulfato de cobre (CuSO₄), sendo 0; 10, 40, 80, 160 e 320 mg kg⁻¹. As doses foram definidas a partir de uma revisão literária com as possíveis doses de efeitos para solos contaminados com Cu (AN et al., 2005; SILVA et al., 2011; BELLANI et al., 2014).

Análise e correção do pH

Para verificar o efeito da calagem do solo sobre a toxicidade do Cu em plantas e organismos edáficos, os tratamentos foram aplicados em solos com e sem correção do pH, a Tabela 2 apresenta os valores de pH de ambos os solos. Para elevar o pH foi utilizado CaCO₃ que foi aplicado sete dias antes do início dos experimentos, buscou-se um pH entre 6 – 7, uma vez que este valor é ideal para o desenvolvimento de *A. sativa* e *V. villosa* (CQFS RS/SC, 2004).

Tabela 2 - Valores médios de pH em KCl em Latossolo Vermelho distrófico e Neossolo Quartzarênico órtico típico, com e sem correção do pH com CaCO₃ (Average pH values in KCl in Oxisol and Entisol, with and without adjustment of the pH with CaCO₃).

	Latossolo Vermelho distrófico		Neossolo Quartzarênico órtico típico		
	pH sem correção	pH corrigido	pH sem correção	pH corrigido	
Controle	5,36	6,33	Controle	4,45	6,58
10	5,14	6,25	10	4,09	6,69
40	5,02	6,19	40	4,25	6,22
80	4,91	6,1	80	4,34	7,37
160	4,83	6,05	160	4,39	6,5
320	4,79	6,02	320	4,41	6,6

Teste de germinação com *A. sativa* e *V. villosa*

O teste de germinação foi baseado no protocolo OECD 208 (2006), utilizando as espécies *A. sativa* (gramínea) e *V. villosa* (leguminosa), com cinco réplicas por tratamento, onde, cada réplica consistiu de uma placa de petry (10 cm de diâmetro, 2 cm de profundidade) preenchida com 100 g solo-teste (com capacidade máxima de retenção de água ajustada para 70%) e 12 sementes. O ensaio teve duração de sete dias, sob temperatura controlada (20±1°C) e foto-período de 16:8h (luz:escuro). Ao final do ensaio, o número de sementes germinadas foi contabilizado e a porcentagem (%) de germinação calculada.

Teste de fuga com enquitreídeos - *E. crypticus*

O teste de fuga com *E. crypticus* neste estudo foi uma adaptação do ISO 17512-2 (2008), conforme descrito por Amorim et al. (2008). Os ensaios foram realizados em recipientes plásticos (11,5 cm de altura e 3,5 cm de diâmetro) que foram divididos em duas partes

iguais. De um lado do recipiente foi colocado 25 g de solo controle e do outro lado a mesma quantidade do solo-teste com diferentes concentrações de CuSO₄. Foram colocados 10 enquitreídeos adultos na linha entre os dois solos. O recipiente foi coberto com uma tampa contendo pequenos orifícios, para permitir para circulação de ar, e o teste foi mantido em temperatura controlada a 20±1 °C, com um fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro), durante 48 horas. No final do ensaio, a divisória foi novamente colocada na zona central, as seções foram alocadas para dois recipientes, onde foi adicionado álcool absoluto e algumas gotas do corante Rosa de Bengala. Posteriormente, procedeu-se a separação dos organismos presentes em cada lado do recipiente, com auxílio de uma peneira de 0,75 mm, sendo os mesmos contados com auxílio de uma lupa.

Análise estatística

A significância das diferenças entre o número de sementes germinadas no solo contaminado e não contaminado, foi verificado com a análise de variância

(ANOVA One-way) seguida pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$), utilizando o Software Statistica 7.0.

A resposta para o teste de fuga de cada solo foi calculada de acordo com a diretriz da ISO 17512-2 (ISO, 2008) utilizando a fórmula: $A = ((C - T)/N) \cdot 100$, onde A = é a porcentagem de fuga, C = é o número de organismos no solo de referência, T = é o número de organismos no solo contaminado, N = é o número total de organismos, e a sua significância ($P \leq 0,05$) avaliada usando o teste de Fisher (ZAR, 1996). Foi estimado o valor de AC_{50} (*Avoidance concentration*) através do software PriProbit 1.63 (SAKUMA, 1998), que confere a dose que estimula 50% de fuga dos organismos para o solo controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste de germinação com *A. sativa* e *V. villosa*

A exposição de sementes de *A. sativa* e *V. villosa* a doses crescentes de $CuSO_4$ não expressou efeito tóxico na taxa de germinação ($P > 0,05$), tanto em Latossolo Vermelho distrófico (Figura 1 e 2) quanto em Neossolo Quartzarênico órtico típico (Figura 3 e 4), independente da correção do pH. Assim pode-se afirmar que até a dose 320 mg kg^{-1} de $CuSO_4$, as plantas não sofrem nenhum efeito de fitotoxicidade ou inibição na germinação. Não foram avaliados efeitos posteriores no desenvolvimento vegetal.

Sabe-se que a presença de Cu no solo, em quantidades maiores que as requeridas pelas plantas, é capaz de permitir a germinação das sementes, no entanto pode afetar o desenvolvimento das mudas, cessando o crescimento das raízes por interferência nas divisões mitóticas (YILDIZ et al., 2009), ou por meio de escassez

de nutrientes para o embrião devido à baixa mobilização de reservas dos cotilédones (KARMOUS et al., 2011).

Muccifora & Bellani (2013) em estudo avaliando o efeito do Cu na germinação de sementes de *V. sativa* não observaram efeitos negativos em doses até 5×10^{-3} M, no entanto o crescimento da raiz foi interrompido na dose de 10^{-3} M, provavelmente devido a um efeito do Cu sobre a divisão celular e alongamento da radícula. Oliveira et al. (2015) avaliando a germinação de *V. sativa* em solos naturais contaminados com resíduo piritoso, o qual contém elevada quantidade de Cu, também não observaram redução na taxa de germinação das sementes.

Apesar da correção do pH não ter influenciando nos resultados, estudos confirmam que a calagem é capaz de reduzir a toxicidade do Cu (NAIDU et al., 1998; JORIS et al., 2012). Porém, são escassos os trabalhos que relatam os efeitos de metais em solos com ou sem calagem. Ambrosini et al. (2015), verificaram que a prática de calagem com 3 Mg ha^{-1} foi capaz de diminuir as concentrações de Cu no solo e aumentar a absorção de cálcio e magnésio pelas plantas, tais efeitos evitam alterações nas estruturas anatômicas nas raízes de plantas expostas a este contaminante.

A baixa fitotoxicidade nos solos contaminados com metais pesados pode ser explicada pelo fato que a capacidade de germinação como variável resposta, apresenta uma baixa sensibilidade em relação a outros parâmetros, como por exemplo, o crescimento inicial das plântulas e desenvolvimento radicular (LOUREIRO et al., 2006). Diante disto, é indicado que as avaliações de fitotoxicidade com metais pesados, incluindo o Cu, sejam realizadas por um maior período de tempo, possibilitado assim acompanhar o desenvolvimento e crescimento das plantas em suas diferentes fases, necessitando dessa forma de avaliações por um período maior, capaz de acompanhar o desenvolvimento da planta e raiz.

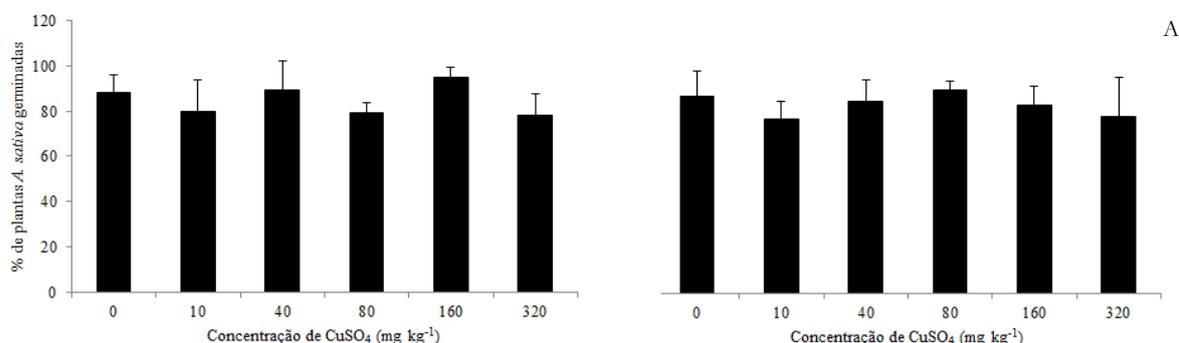


Figura 1 – Percentagem de germinação de plantas da espécie *A. sativa* em Latossolo Vermelho distrófico contaminado com doses crescente de $CuSO_4$, (A) solo sem correção do pH e (B) solo com correção de pH. ($P > 0,05$) pelo teste de Dunnett. (↗) desvio padrão ($n = 5$).

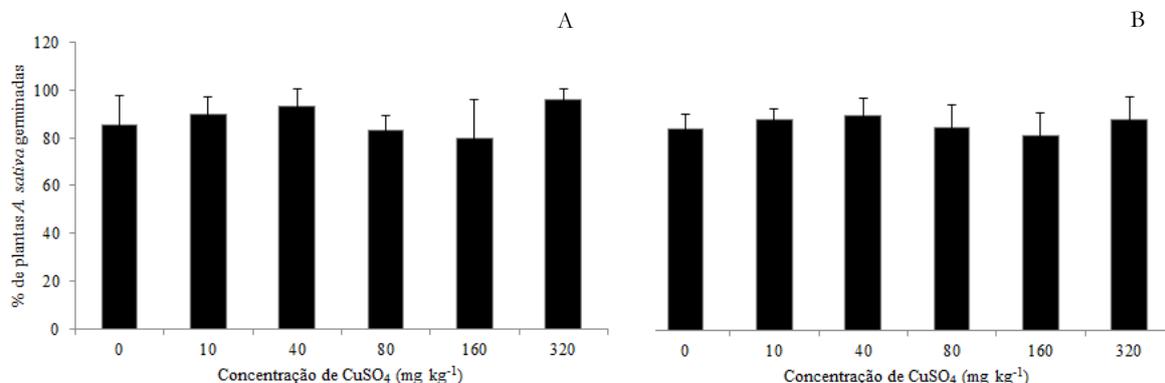


Figura 2 – Percentagem de germinação de plantas da espécie *A. sativa* em Neossolo Quartzarênico ótico típico contaminado com doses crescente de CuSO₄, (A) solo sem correção do pH e (B) solo com correção de pH. ($P > 0,05$) pelo teste de Dunnett. (⌈) desvio padrão (n=5).

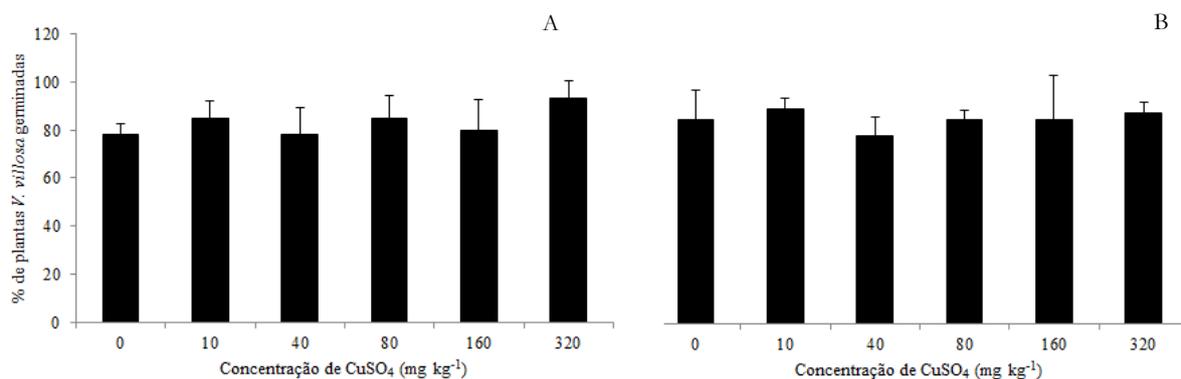


Figura 3 – Percentagem de germinação de plantas da espécie *V. villosa* em Latossolo Vermelho distrófico contaminado com doses crescente de CuSO₄, (A) solo sem correção do pH e (B) solo com correção de pH. ($P > 0,05$) pelo teste de Dunnett. (⌈) desvio padrão (n=5).

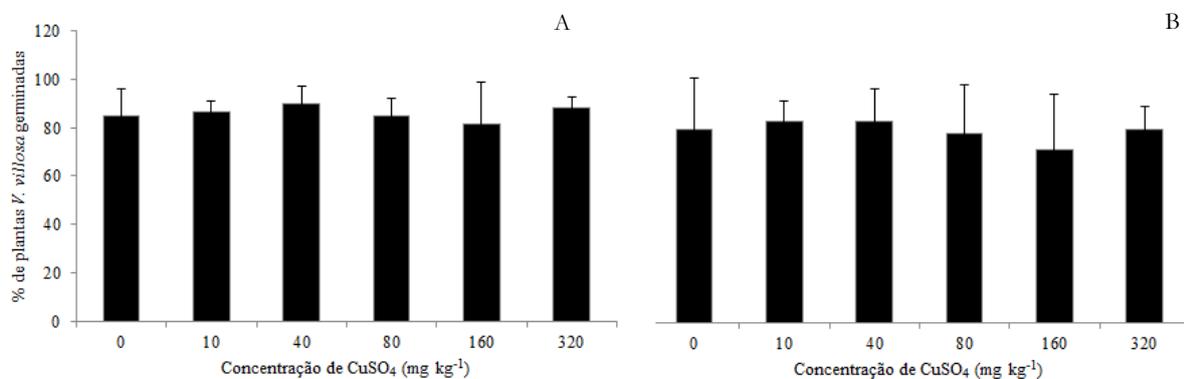


Figura 4 – Percentagem de germinação de plantas da espécie *V. villosa* em Neossolo Quartzarênico ótico típico contaminado com doses crescente de CuSO₄, (A) solo sem correção do pH e (B) solo com correção de pH. ($P > 0,05$) pelo teste de Dunnett. (⌈) desvio padrão (n=5).

Teste de fuga com enquitreídeos *E. crypticus*

O ensaio de fuga com *E. crypticus* atendeu as normas de validação segundo a ISO 17512-2 (2008), onde a mortalidade nas doses foi inferior a 20% (não houve mortalidade), e a distribuição dos organismos no duplo controle ficou dentro da faixa requerida de 60-40%, sendo no Latossolo Vermelho distrófico de 50-50% e 54-46% no solo sem e com pH corrigido, respectivamente. Já o Neossolo Quartzarênico órtico típico teve distribuição no duplo controle de 58-42% e 52-48% no solo sem e com pH corrigido, respectivamente.

A resposta de fuga dos organismos foi observada em ambos os solos independente do valor de pH ($P < 0,05$). Para o Latossolo foi observada a fuga significativa já na primeira dose avaliada de 10 mg kg^{-1} , mantendo em todas as doses uma resposta semelhante em torno de 30 - 40% de fuga para o solo controle (Figuras 5A e 5B). Já para o Neossolo também foi observada fuga significativa, no entanto, o solo sem correção do pH apresentou fuga a partir da dose de 80 mg kg^{-1} (Figura 6A), enquanto o solo com pH corrigido apresentou fuga já na dose de 10 mg kg^{-1} (Figura 6B). Apenas o Neossolo sem correção do pH apresentou fuga suficiente para calcular o valor de AC_{50} (*Avoidance concentration*), que determina a dose que apresenta 50% de fuga dos organismos, sendo o valor de AC_{50} de 238,80 (intervalo de confiança de 212,31 – 334,50 mg kg^{-1}). Os demais tratamentos não apresentaram fuga suficiente para calcular o valor de AC_{50} .

Tais resultados suportam a importância de se desenvolver ensaios de fuga com esse tipo de organismo, atualmente existe apenas o protocolo para testes crônicos e agudos de sobrevivência e reprodução com enquitreídeos (ISO 16387, 2004), apesar da grande importância desses testes para determinar o potencial tóxico dos compostos, eles possuem como desvantagens serem relativamente longos, enquanto os testes de fuga são de fácil e rápida execução e apresentam sensibilidade igualmente elevada (AMORIM et al., 2008).

A fuga dos *E. crypticus* nos solos contaminados com CuSO_4 pode ser explicada pelo fato desses organismos possuírem órgãos sensoriais – quimiorreceptores – altamente sensíveis a substâncias químicas no ambiente (EDWARDS & BOHLEN, 1996). Apesar de ser um elemento essencial o Cu se torna tóxico para oligoquetas, dependendo da concentração (AMORIM & SCOTT-FORDSMAND, 2012). O modo de ação tóxico do Cu está relacionado a danos oxidativo em organismos através da reação Haber - Weiss, catalisando a formação do radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) que é um poderoso oxidante (BREMNER, 1998; GÓMES et al., 2012). Enquitreídeos *Enchytraeus albidus* (oligoqueta) expostos à concentrações crescentes

de CuCl_2 , apresentam sobrevivência reduzida e baixa reprodução (AMORIM et al., 2005).

Amorim et al. (2008) realizaram ensaios de fuga com enquitreídeos da espécie *E. albidus*, com diferentes contaminantes, e encontraram o valor de AC_{50} para Cu de 133 mg kg^{-1} ($26 - 956 \text{ mg kg}^{-1}$), aproximadamente 100 mg acima do encontrado no presente trabalho, fato este pode estar relacionado com o tipo de solo, a espécie e até a forma química do Cu. Amorim & Scott-Fordsmand (2012) também verificaram fuga de *E. albidus* em solos contaminados com CuCl_2 e nanopartículas de Cu, apresentando os valores de AC_{50} de 475 mg kg^{-1} ($378 - 573 \text{ mg kg}^{-1}$) para CuCl_2 ; e 241 mg kg^{-1} ($188 - 295 \text{ mg kg}^{-1}$) para nanopartícula de Cu.

Apesar das propriedades físico-químicas dos solos no presente estudo (Latosolo ou Neossolo) serem bastante distintas, nossos dados indicam que não houve diferenças na toxicidade do CuSO_4 em relação aos solos. Resultados semelhantes foram observados por Konečný et al. (2014) onde não observaram diferenças na reprodução de *E. crypticus* em solos com diferentes propriedades físico-químicas contaminados com Cu.

Deste modo, existe uma indicação de que oligoquetas são capazes de detectar e evitar solos contaminados com Cu, no entanto não foi possível observar diferenças em relação ao tipo de solo e valor de pH, podendo assim ser indicado estudos com maior duração (sobrevivência e reprodução) para determinar tais fatores.

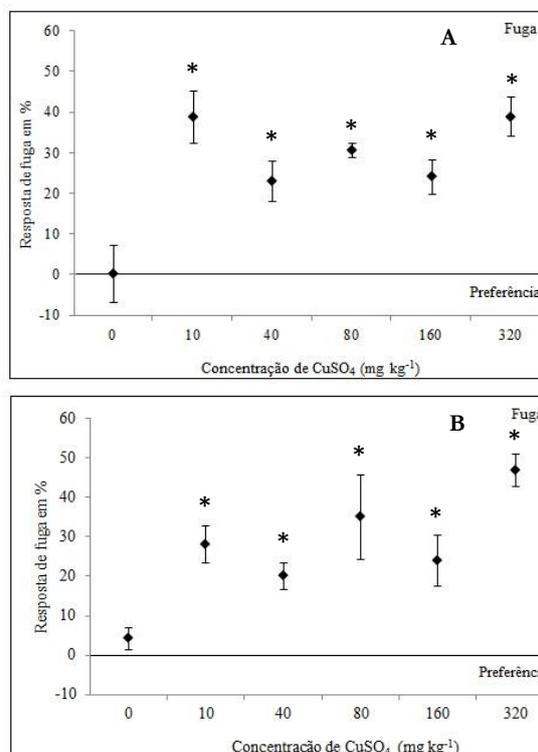


Figura 5- Resposta de fuga de enquitreídeos *E. crypticus*, em Latossolo Vermelho distrófico contaminado com

doses crescentes de CuSO_4 . (A) solos sem correção do pH e (B) solo com correção de pH.

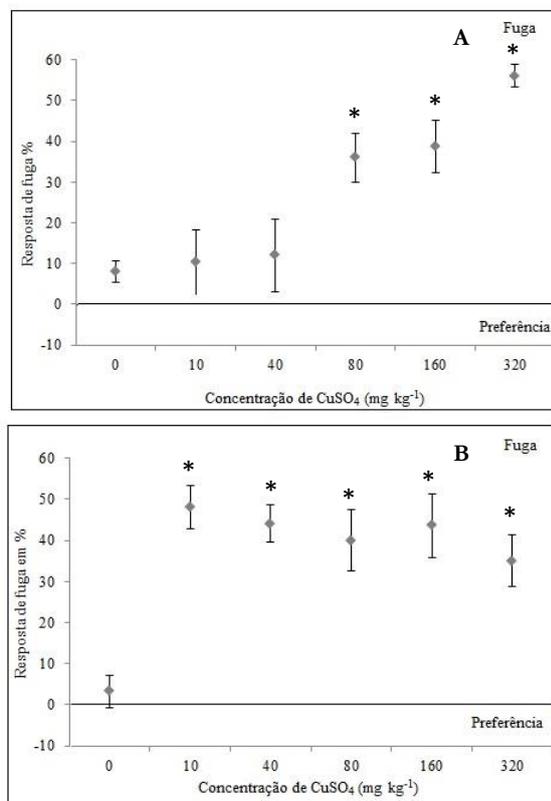


Figura 6- Resposta de fuga de enquitreídeos *E. crypticus*, em Neossolo Quartzarênico órtico típico contaminado com doses crescentes de CuSO_4 . (A) solos sem correção do pH e (B) solo com correção de pH.

CONCLUSÃO

Os resultados mostram que a contaminação de diferentes tipos de solos naturais com doses crescentes de CuSO_4 não afetou a taxa de germinação de sementes de *Avena sativa* e *Vicia villosa*, indiferente da correção do pH do solo. No entanto, os resultados com enquitreídeos *E. crypticus* demonstram que houve fuga em ambos os solos avaliados (LVd e RQo), indicando que oligoquetas são capazes de detectar e evitar solos contaminados com Cu.

REFERÊNCIAS

AGBENIN, J. O.; OLOJO, L. A. Competitive adsorption of copper and zinc by a Bt horizon of a savanna Alfisol as affected by pH and selective removal of hydrous oxides and organic matter. *Geoderma*. v. 119, p. 85-95, 2004.

AMBROSINI, V. G.; ROSA, D. J.; PRADO, J. P. C.; BORGHEZAN, M.; MELO, G. W. B.; SOARES, C.

R.F.S.; COMIN, J.J.; SIMÃO, D.G.; BRUNETTO, G. Reduction of copper phytotoxicity by liming: A study of the root anatomy of young vines (*Vitis labrusca* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*. v. 96, p. 270-280, 2015.

AMORIM, M.; ROMBKE, J.; SOARES, A. Avoidance behaviour of *Enchytraeus albidus*: Effects of Benomyl, Carbendazim, phenmedipham and different soil types. *Chemosphere*. v. 59, p. 501-510, 2005.

AMORIM, M. J. B.; RÖMBKE, J.; SCHALLNASS, H.; SOARES, A. M. V. M. Effect of soil properties and aging on the toxicity of copper for *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus luxuriosus* and *Folsomia candida*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. v. 24, p. 1875-1885, 2005.

AMORIM, M.J.; NOVAIS, S.; RÖMBKE, J.; SOARES, A.M. Avoidance test with *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): effects of different exposure time and soil properties. *Environmental Pollution*. v. 155, p. 112-6, 2008.

AMORIM, M. J. B.; SCOTT-FORDSMAN, J. J. Toxicity of copper nanoparticles and CuCl_2 salt to *Enchytraeus albidus* worms: survival, reproduction and avoidance responses. *Environmental Pollution*. v. 164, p. 164-168, 2012.

AN, Y. J. Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. *Chemosphere*. v. 62, p. 1359-1365, 2005.

BELLANI, L. M.; MUCCIFORA, S.; GIORGETTI, L. Response to copper bromide exposure in *Vicia sativa* L. seeds: Analysis of genotoxicity, nucleolar activity and mineral profile. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 107, p. 245-250, 2014.

BREMNER, I. Manifestations of copper excess. *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 67, p. 1069-1073, 1998.

CAMBROLLÉ, J.; GARCÍA, J. L.; Figueroa, M.E.; Cantos, M. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. *Chemosphere*. v. 120 p. 171-178, 2015.

CHANEY, R. L.; OLIVER, D. P. Contaminants and the Soil Environment in the Australasia-Pacific Region, *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, 1996.

CQFS RS/SC (Commission of Chemistry, Soil Fertility-RS/SC). *Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina Sociedade Brasileira de Ciência do Solo- Núcleo Regional Sul PortoAlegre / RS*, 2004.

EDWARDS, C. A.; BOHLEN, P. J. *Biology and Ecology of Earthworms*. Chapman & Hall, London, 1996.

EMBRAPA Empresa brasileira de pesquisa agropecuária. *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006.

GOMES, S. I. L.; NOVAIS, S. C.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L.; SCOTT-FORDSMAND, J.; SOARES, A. M. V. M.; AMORIM, M. J. B. Effect of Cu-Nanoparticles versus one Cu-salt: analysis of stress biomarkers response in *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta). *Nanotoxicology*. v. 6, p. 134-143, 2012.

ISO International Organization for Standardization. *Soil quality - Effects of pollutants on Enchytraeidae (Enchytraeus sp.) - Determination of effects on reproduction and survival*. ISO 16387. Geneva, 2004.

ISO International Organization for Standardization. ISO 17512-2: *Soil quality - Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior -- Pt 1: Test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)*. Genève, Switzerland, p. 25, 2008

JORIS, H. A. W.; FONSECA, A. F.; ASAMI, V. Y.; BRIEDIS, C.; BORSZOWSKI, P. R.; GARBUIO, F. J. Adsorção de metais pesados após calagem superficial em um Latossolo sob sistema de plantio direto. *Revista Ciência Agronômica*. v. 43: p. 1-10, 2012.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. *Trace elements in soils and plants*. Florida: CRC Press LLC, 2001.

KARMOUS, I.; EL FERJANI, E.; CHAOUI, A. Copper excess impairs mobilization of storage proteins in bean cotyledons. *Biological Trace Element Research*. v. 144, p. 1251-1259, 2011.

KONEČNÝ, L.; ETTLER, V.; KRISTIANSEN, S. M.; AMORIM, M. J. B.; KRÍBEK, B.; MIHALJEVIČ, M.; ŠEBEK, O.; NYAMBE, I.; SCOTT-FORDSMAND, J. J. Response of *Enchytraeus crypticus* worms to high metal levels in tropical soils polluted by copper smelting. *Journal of Geochemical Exploration*. v. 144, p. 427-32, 2014.

LEQUEUX, H.; HERMANS, C.; LUTTS, S.; VERBRUGGEN, N. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiology and Biochemistry*. v. 48, p. 673-682, 2010.

LIU, X.; ZHANG, S.; SHAN, X.; ZHU, Y. G. Toxicity of arsenate and arsenite on germination seedling growth and amylolytic activity of wheat. *Chemosphere*. v. 61, p. 293-301, 2005.

LOUREIRO, S.; SANTOS, C.; PINTO, G.; COSTA, A.; MONTEIRO, M.; NOGUEIRA, A. J. A.; SOARES,

A. M. Toxicity assessment of two soils from Jales mine (Portugal) using plants: Growth and biochemical parameters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. v. 50, p. 182-90, 2006.

McGRATH, D.; FLEMING, G. A.; McCORMACK, R. F.; POOLE, D. B. R. Effects of applying copper-rich pig slurry to grassland. 2. Land-spreading trial Irish. *Journal of Agriculture Research*. v.21, p. 49-60, 1982.

MCLAUGHLIN, M. J.; HAMON, R. E.; MCLAREN, R. G.; SPEIR, T. W.; ROGERS, S. L. Review: a bioavailability-based rationale for controlling metal and metalloid contamination of agricultural land in Australia and New Zealand. *Australian Journal of Soil Research*. v. 38 p. 1037-1086, 2000.

MUCCIFORA, S.; BELLANI, L. M. Effects of copper on germination and reserve mobilization in *Vicia sativa* L. seeds. *Environmental Pollution*. v. 179, p. 68-74, 2013.

NAIDU, R.; SUMNER, M. E.; HARTER, R. D. Sorption of heavy metals in strongly weathered soils: an overview. *Environmental Geochemistry and Health*. v. 20, p. 5-9, 1998.

OEDC - Organization for Economic Co-Operation and Development. *Guidelines for testing of chemicals*. Test n° 208: Terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. Paris, 2006.

OLIVEIRA, L. C. I.; BARETTA, D.; ZORTÉA, T.; CASAROTTO, K.; CAMPOS, M. L.; SANTOS, J.C.P. Avaliação ecotoxicológica de Resíduos de mineração de carvão. *Revista Brasileira Ciência do Solo*. v. 39, p. 1806-1813, 2015.

RUYTERS, P.; SALAETS, K.; OORTS, E. Smoldres Copper toxicity in soils under established vineyards in Europe: a survey. *Science Total Environmental*. v. 443, p. 470-477, 2013.

SACRISTÁN, D.; ROSSEL, R. A. V.; RECATALÁ, L. Proximal sensing of Cu in soil and lettuce using portable X-ray fluorescence spectrometry. *Geoderma*. v. 265, p 1-6, 2016.

SAKUMA, M. Probit analysis of preference data. *Applied Entomology and Zoology*. Tokyo, v.33, n.3, p. 339-347, 1998.

SILVA, R. F.; SAIDELLES F. L. F.; SILVA, A. S.; BOLZAN J. S. Influência da contaminação do solo por cobre no crescimento e qualidade de mudas de açaite-cavalo (*Laebea divaricata* Mart. & Zucc.) e aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 21, p. 111-118, 2011.

SPARKS, D. L. *Environmental soil chemistry*. San Diego: Elsevier, 2003.

TURRA, C.; FERNANDES, E. A. N.; BACCHI, M. A. Evaluation on rare earth elements of Brazilian agricultural supplies. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*. v. 3, p. 86-92, 2011.

van GESTEL, C. A. M.; BORGMAN, E.; VERWEIJ, R. A.; ORTIZ, M. D. The influence of soil properties on the toxicity of molybdenum to three species of soil invertebrates. *Ecotoxicological Environmental Safety*. v. 74, p. 1-9, 2011.

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

YILDIZ, M.; CİĞERCI, İ. H., KONUK, M.; FIDAN, A. F.; TERZI, H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere*. v. 75, p. 934-938, 2009.

ZAR, J. H. *Biostatistical Analysis*. London: Prentice-Hall, 1996. 3ed.