
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GIOVANNA TAVARES LIMA

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE SOLO
CONTAMINADO POR NECROCHORUME,
UTILIZANDO INVERTEBRADOS TERRESTRES
COMO BIOINDICADORES**



Rio Claro - SP
2024

GIOVANNA TAVARES LIMA

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE SOLO CONTAMINADO POR
NECROCHORUME, UTILIZANDO INVERTEBRADOS TERRESTRES
COMO BIOINDICADORES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales
Co-orientadora: Ma. Letícia Rosa de Souza

Rio Claro - SP
2024

L732a

Lima, Giovanna Tavares

Avaliação ecotoxicológica de solo contaminado por necrochorume, utilizando invertebrados terrestres como bioindicadores / Giovanna Tavares Lima. -- Rio Claro, 2024

52 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Maria Aparecida Marin Morales

Coorientadora: Letícia Rosa de Souza

1. Contaminação de cemitérios. 2. Simulação de inumação. 3. Invertebrados do solo. 4. Ecotoxicologia terrestre. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

GIOVANNA TAVARES LIMA

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE SOLO CONTAMINADO POR
NECROCHORUME, UTILIZANDO INVERTEBRADOS TERRESTRES
COMO BIOINDICADORES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales (orientadora)

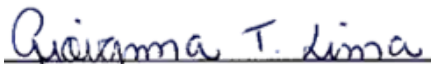
Profa. Dra. Letícia Rosa de Souza (coorientadora)

Profa. Dra. Cassiana Maria Reganhan Coneglian


Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Aprovado em: 04 de junho de 2024

Assinatura da discente


Giovanna Tavares Lima

Assinatura da orientadora


Profª Drª Maria Aparecida Marin
Morales

Assinatura da coorientadora


Ma. Letícia Rosa de Souza

*Dedico este trabalho aos meus pais, Sandra e
Valter, que, sob muito sol, me fizeram chegar até
aqui, na sombra.*

AGRADECIMENTOS

Se cheguei até aqui, devo, de fato, agradecer a muitos, pois sozinha jamais conseguiria. A jornada não foi simples e exigiu renúncias, além de um esforço quase heroico ao longo desses seis anos. Reconheço meu próprio empenho, mas sei que não teria atingido este marco sem apoio. Sou a continuação do sonho de muitos que vieram antes de mim.

Aos meus pais, Valter e Sandra, que nunca mediram esforços para que todos os meus sonhos se concretizassem. A educação, o apoio, o incentivo, o carinho e o amor que vocês me proporcionaram jamais poderão ser expressos em palavras. Às minhas irmãs, Thaís e Bianca, que são meus maiores exemplos, agradeço por sempre estarem ao meu lado, proporcionando leveza e alegria nos momentos difíceis. Amo vocês com todo o meu coração.

Aos meus amigos e companheiros de alma, Ana Carolina, Brenda e Gabriel, que estiveram comigo em cada passo dessa jornada, sendo as pitangas do meu pitangueiro. Agradeço pelo carinho e pelas incontáveis horas de conversa que me ajudaram a manter o equilíbrio. Obrigada por serem minha morada em Rio Claro, trazendo momentos de descontração e oferecendo palavras de motivação quando eu mais precisava. Amo vocês.

À minha orientadora, Marin, por sua força, liderança e compromisso com seus orientandos. Seu entusiasmo e paixão pela pesquisa nos motivaram a seguir adiante, mostrando que, apesar do incêndio, o conhecimento e a ciência são inabaláveis. Obrigada por me ensinar a lição mais importante: resiliência.

À minha coorientadora, Letícia Rosa, por toda a disposição, mentoria e cantoria no laboratório, por acreditar neste trabalho e me ajudar a fazer com que ele ganhasse forma. Você é extraordinária!

A todos os colegas do Laboratório de Mutagênese Ambiental, onde me desenvolvi como cientista, pela colaboração e pelo suporte mútuo que nos impulsionou a alcançar resultados melhores. Em especial, agradeço a Adriana Corrêa por todo o apoio, os ensinamentos, os puxões de orelha e todas as risadas que tornaram a rotina mais leve.

Cada um de vocês contribuiu de maneira única para a realização deste TCC, e por isso, sou eternamente grata.

RESUMO

Os cemitérios estão entre as principais fontes antropogênicas de poluição ambiental. O principal contaminante desses ambientes é um líquido tóxico, proveniente da decomposição dos cadáveres, denominado de necrochorume. O potencial tóxico deste líquido se deve, principalmente, à presença de substâncias orgânicas, como as aminas biogênicas cadaverina e putrescina. Os cemitérios configuram um problema ambiental e sanitário sério; portanto, devem ser constantemente monitorados para se evitar problemas irreversíveis para o meio ambiente e para a sociedade. Uma boa estratégia para se avaliar a toxicidade do solo é por meio de bioensaios ecotoxicológicos que, por serem preditivos, permitem estimar, com antecedência, os efeitos adversos dos contaminantes. Deste modo, o presente estudo propôs avaliar o potencial tóxico de amostras de solo contaminado por necrochorume obtidas de simulação de inumação de carcaça suína, por meio de ensaios de reprodução e comportamento de fuga, com os invertebrados terrestres *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus*. Foram analisados dois tipos de solos contaminados, um coletado após 7 meses e outro 10 meses da segunda inumação (recontaminação) de carcaça suína (*Sus scrofa*) no local. Os resultados mostraram que ambos os solos induziram a diminuição da reprodução dos organismos, caracterizando uma toxicidade crônica do composto. Nos resultados obtidos a partir dos testes de comportamento de fuga, foi observado que o solo contaminado com necrochorume causa um impacto negativo no comportamento de *F. candida*, com 88 e 84% de fuga, e *E. crypticus*, com 94 e 80% de fuga, para as amostras coletadas 7 e 10 meses após a segunda inumação, respectivamente. Neste estudo foi possível inferir que a toxicidade do solo, para este estágio da decomposição, está relacionada com variações de pH. Solos ácidos inibem a reprodução de invertebrados e estimulam o comportamento de fuga desses organismos. Também foi observado no estudo que *E. crypticus* e *F. candida* são importantes bioindicadores de qualidade do solo e do impacto ambiental por contaminantes orgânicos.

Palavras-chave: ecotoxicologia terrestre; alteração de pH; simulação de contaminação de cemitérios; invertebrados de solo; aminas biogênicas.

ABSTRACT

Cemeteries are among the main anthropogenic sources of environmental pollution. The primary contaminant in these areas is a toxic liquid from the decomposition of cadavers, known as necro-leachate. The toxic potential of this liquid is primarily due to the presence of organic substances, such as the biogenic amines cadaverine and putrescine. Cemeteries represent a serious environmental and public health issue; hence, they must be continuously monitored to prevent irreversible damage to the environment and society. A useful strategy for assessing soil toxicity is through ecotoxicological bioassays, which, being predictive, allow the adverse effects of contaminants to be estimated in advance. Therefore, this study aimed to evaluate the toxic potential of necro-leachate contaminated soil samples obtained from the simulation of swine carcass burial, through reproduction and avoidance behavior assays using the terrestrial invertebrates *Folsomia candida* and *Enchytraeus crypticus*. Two types of contaminated soils were analyzed, one collected after 7 months and the other 10 months following the second burial (re-contamination) of swine carcasses (*Sus scrofa*) at the site. The results showed that both soils reduced in the organisms' reproduction, characterizing chronic toxicity of the compound. Results from the avoidance behavior tests indicated that necro-leachate contaminated soil negatively impacts the behavior of *F. candida*, with 88% and 84% avoidance, and *E. crypticus*, with 94% and 80% avoidance, for samples collected 7 and 10 months after the second burial, respectively. This study inferred that soil toxicity, for this stage of decomposition, is related to pH variations. Acidic soils inhibit the reproduction of invertebrates and stimulate their avoidance behavior. The study also demonstrated that *E. crypticus* and *F. candida* are important bioindicators of soil quality and environmental impact from organic contaminants.

Keywords: soil ecotoxicology; pH alteration; cemetery contamination simulation; soil invertebrates; biogenic amines.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo geral.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1 Processo de decomposição cadavérica e utilização de modelos animais para estudos tafonômicos.....	11
3.2 Necrochorume.....	13
3.3 Invertebrados terrestres como bioindicadores.....	14
3.3.1 <i>Folsomia candida</i>	14
3.3.2 <i>Enchytraeus crypticus</i>	16
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Simulação do processo de decomposição.....	18
4.2 Solo Artificial Tropical (SAT).....	20
4.3 Cálculo da capacidade de retenção de água no solo (WHC).....	20
4.4 Análise química das amostras.....	21
4.5 Manutenção dos invertebrados bioindicadores.....	22
4.5.1 <i>Manutenção dos colêmbolos</i>	22
4.5.2 <i>Manutenção dos enquitreídeos</i>	23
4.6 Ensaio de ecotoxicidade com <i>Folsomia candida</i>	24
4.6.1 <i>Teste de comportamento de fuga</i>	24
4.6.2 <i>Toxicidade crônica: Teste de reprodução</i>	25
4.7 Ensaio de ecotoxicidade com <i>Enchytraeus crypticus</i>	27
4.7.1 <i>Teste de comportamento de fuga</i>	27
4.7.2 <i>Toxicidade crônica: Teste de reprodução</i>	28
4.8 Análises estatísticas dos resultados.....	29
4.8.1 <i>Teste de reprodução</i>	29
4.8.2 <i>Teste de fuga</i>	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 Análise química das amostras.....	31
5.2 Ensaio de ecotoxicidade com <i>E. crypticus</i>	32
5.2.1 <i>Teste de reprodução</i>	32
5.2.2 <i>Teste de fuga</i>	35
5.3 Ensaio de ecotoxicidade com <i>F. candida</i>	37
5.3.1 <i>Teste de reprodução</i>	37
5.3.2 <i>Teste de fuga</i>	39
6 CONCLUSÃO.....	42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

Diversas atividades humanas, resultantes da expansão urbana e do processo de industrialização, são conhecidas, em uma escala global, como fontes de contaminação ambiental. Neste contexto, os ambientes cemiteriais se destacam pela geração de resíduos químicos e biológicos, provenientes do processo de decomposição cadavérica, que podem afetar os diversos compartimentos ambientais (solo, águas superficiais e subterrâneas) e à saúde humana (Neckel et al., 2021; Gonçalves et al., 2022; Viegas et al., 2022). Gonçalves et al. (2024) destacam que os impactos das atividades cemiteriais estão relacionados, principalmente, à falta de planejamento estrutural prévio para implantação de um cemitério; instalações dos mesmos em locais inadequados; e supervisão ineficaz, por parte das autoridades responsáveis.

Neste contexto, existe no mundo um grande número de cemitérios que foram implantados em locais que não passaram por análises prévias, para a verificação da sua adequação para receber os contaminantes da decomposição dos cadáveres, o que coloca em risco tanto o meio como a população local (Keijzer, 2017; Crisanto-Perrazo et al., 2022; Flores Gómez, 2022). Como essa contaminação específica dos cemitérios é, geralmente, negligenciada pelos órgãos públicos responsáveis, pouco é divulgado para a população sobre os seus perigos. Por esta razão, grande parte da população desconhece esses riscos e acaba se expondo aos componentes tóxicos desses ambientes (Afangideh; Udokpoh, 2022).

Os problemas relacionados à contaminação dos cemitérios estão também associados ao aumento populacional acelerado e contínuo, que leva a uma necessidade de mais espaços para a disposição dos cadáveres, muitas vezes não adequados, devido às condições geológicas desfavoráveis desses locais (Idehen; Ezenwa, 2019; Gonçalves et al, 2022; Netto et al., 2021). O aumento da população gera também um adensamento populacional nos ambientes urbanos, colocando a população, cada vez mais, próximas das áreas dos cemitérios, uma vez que estes foram projetados para serem dispostos na periferia dos ambientes urbanos (Quinton et al., 2020).

Somado a esses problemas infraestruturais e sociais, nos últimos anos houve um agravamento do problema de contaminações nesses ambientes, dado ao

aumento da mortalidade decorrente da pandemia SARS-CoV-2. No período da pandemia, foi registrado, no Brasil, mais de 4 mil óbitos/dia (Toscan et al., 2022) e, até abril de 2024, um total de 711.650 óbitos pela Covid-19 (Brasil, 2024), o que acarretou no aumento da contaminação nesses locais.

De acordo com Kandoli et al. (2019), um cadáver de cerca de 70 kg pode liberar cerca de 30 litros de necrochorume, em um período de até 3 anos após a morte. O necrochorume é um líquido composto por água, sais minerais e substâncias orgânicas, com destaque para as aminas biogênicas cadaverina (C₅H₁₄N₂) e putrescina (C₄H₁₂N₂). Essas substâncias são consideradas tóxicas e responsáveis pelo odor desagradável característico desse fluido corpóreo (Crisanto-Perrazo et al., 2022; Gonçalves et al., 2022).

Tendo em vista que nos cemitérios horizontais, o solo é a primeira matriz a receber o necrochorume, torna-se importante avaliar os impactos deste contaminante com bioindicadores relacionados aos ambientes edáficos (Neckel et al., 2021). Os estudos ecotoxicológicos com bioindicadores do solo determinam importantes características da toxicidade de diversos contaminantes, como limite de tolerância, alterações fisiológicas, morfológicas e comportamentais (Teles et al., 2024). Dentre os bioindicadores usados em avaliações de qualidade de solos, os organismos modelos *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus*, utilizados neste estudo, se destacam, devido à sua facilidade de cultivo e manipulação em laboratório, além de apresentarem sensibilidade a uma ampla gama de contaminantes (Milano et al., 2018; Wang et al., 2022).

Considerando que os impactos ambientais causados pelo necrochorume ainda são pouco avaliados e, conseqüentemente, pouco compreendidos, o presente estudo visou buscar informações sobre a toxicidade de solo contaminado por necrochorume, por meio de um estudo controlado (simulação) da decomposição de uma carcaça suína, utilizando para esta avaliação ecotoxicologia os bioindicadores terrestres *F. candida* e *E. crypticus*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar, por meio de ensaios ecotoxicológicos realizados com os bioindicadores terrestres *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus*, o potencial tóxico de amostras de solos contaminados por necrochorume, obtidas de simulação de inumação de carcaça suína.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial tóxico do solo contaminado com necrochorume, por meio do teste de reprodução e comportamento de fuga, com colêmbolos da espécie *Folsomia candida*;
- Avaliar o potencial tóxico do solo contaminado com necrochorume, por meio do teste de reprodução e comportamento de fuga, com enquitreídeos da espécie *Enchytraeus crypticus*;
- Comparar a toxicidade crônica e comportamental de solos obtidos de simulação de inumação de carcaça suína, entre diferentes organismos testes, para estimar as sensibilidades dos mesmos e, conseqüentemente, estabelecer um protocolo de bioensaios para avaliar a extensão da contaminação de ambientes de cemitérios;
- Contribuir para a melhor compreensão do modo de ação biológica e dos impactos aos solos (disseminação vertical do poluente) causados por necrochorume.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Processo de decomposição cadavérica e utilização de modelos animais para estudos tafonômicos

Os estudos da decomposição cadavérica, realizados para estimar o processo de decomposição humana, em determinada condição ambiental, são desenvolvidos com organismos análogos ao homem (Stokes et al., 2013). Esses modelos são necessários, devido às dificuldades de realização de estudo com cadáveres humanos, pelas restrições éticas e culturais que limitam seu uso. Assim, os estudos dos processos de decomposição dos corpos são desenvolvidos com uma variedade de carcaças, ou tecidos musculares esqueléticos de mamíferos, que apresentem certa analogia com as características humanas, como porcos (Matuszewski et al., 2020; DeBruyn et al., 2021; Dawson et al., 2022; Geissenberger et al., 2023), ovelhas (Tembe et al., 2021; Jin et al., 2022), ratos (Al-Mekhlafi, 2021; Fang et al., 2023), veados (Melis et al., 2007; Schwegmann et al., 2022) coelhos (Bachmann; Simmons, 2010; Al-Qahtni et al., 2021). Por estudos já realizados, foi verificado que os análogos são bons modelos para estudar uma variedade de parâmetros, como a sucessão de insetos (Mcintosh et al., 2017; Castro et al., 2019), a química da decomposição (Armstrong et al., 2016; Barton et al., 2020), a atividade microbiana (Ki et al., 2018; DeBruyn et al., 2021) e o processo geral da decomposição (Hau et al., 2014).

O porco doméstico (*Sus scrofa domesticus* L.) tem sido amplamente usado como modelo para estudos do processo de decomposição cadavérica. Sua utilização está relacionada às semelhanças na anatomia interna dos órgãos, dieta onívora, microbiota intestinal, densidade tecidual, dentre outras (Pakosh, 2009; Connor et al., 2018).

Os estudos que utilizam porcos domésticos, para avaliação de processos de decomposição cadavérica, se concentram na compreensão da colonização e sucessão da entomofauna cadavérica (Wang et al., 2017), sucessão microbiana (Pechal et al., 2013) e estimativa de intervalos pós-morte (Szelec et al., 2018). Paralelamente, cadáveres de porcos também são usados para testar novas técnicas forenses ou validar as já estabelecidas, como o imageamento térmico para localização de cadáveres (Amendt et al., 2017; Lee et al., 2018). Muitas dessas

técnicas também são aplicadas hoje em investigações forenses de seres humanos, mostrando que os porcos são muito versáteis como modelos de cadáveres (Matuszewski et al., 2020).

É importante notar que o processo de decomposição segue as mesmas etapas em todos os mamíferos, mas certas características do corpo e do ambiente podem variar, como o intervalo entre cada fase (Ioan et al., 2017). Em relação aos cadáveres humanos, diversos fatores, como roupas, idade, peso, conteúdo estomacal, estado nutricional e hidratação, podem influenciar no tempo de decomposição. Por outro lado, fatores ambientais, como pH, temperatura, umidade e tipo de solo, também desempenham um papel importante na decomposição (Ioan et al., 2017; Antonio et al., 2018).

Para Payne (1965), existem cinco fases definidas no processo de decomposição cadavérica: pré-esqueletização: fase fresca; inchaço corporal; decomposição ativa; decomposição avançada; e fase seca, conforme caracterizadas no Quadro 1.

Quadro 1. Principais características das etapas do processo de decomposição.

Etapas	Características gerais	Tempo
Fase fresca	Mínimas alterações macroscópicas; ausência de entomofauna cadavérica.	Minutos a horas, após a morte.
Inchaço corporal	Inchaço devido ao acúmulo de gases no abdômen; alteração da coloração corporal para tons de cinza e verde.	Horas a dias, após a morte.
Decomposição ativa	Intensa atividade de insetos; odores fortes e liberação de fluidos da decomposição (necrochorume).	Dias a semanas, após a morte.
Decomposição avançada	Descoloração da pele; diminuição de odor.	Semanas a meses, após a morte.
Fase seca	Pequenos fragmentos de pele; presença de remanescentes ósseos.	Meses a anos, após a morte.

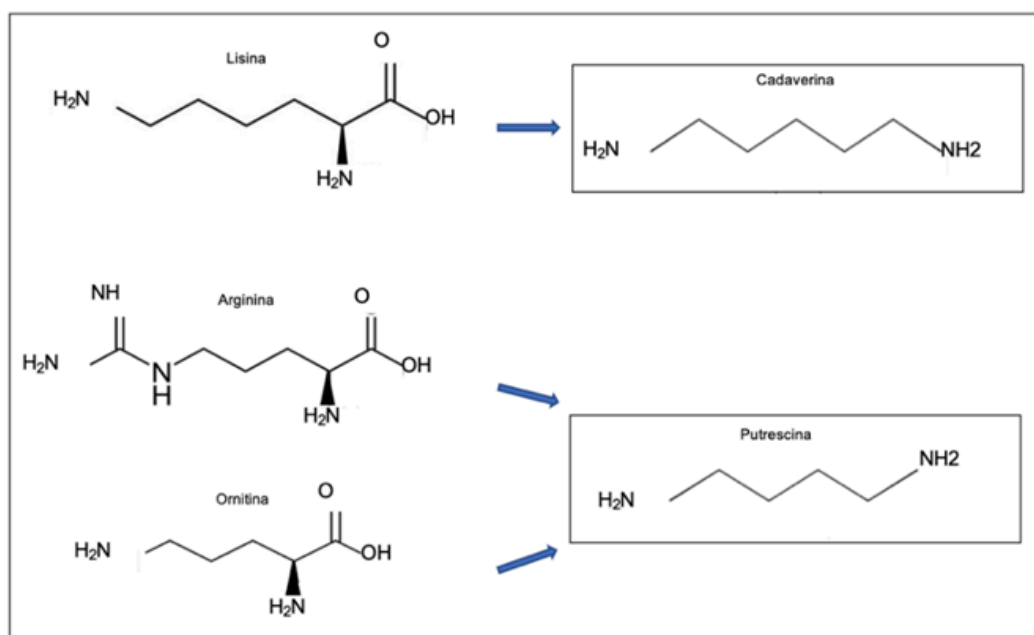
Fonte: Adaptado de Payne (1965).

3.2 Necrochorume

O necrochorume, conhecido como “produto da coliquação” pela CONAMA n° 335/2003 (Brasil, 2003), é um líquido produzido durante o processo de decomposição cadavérica, considerado o principal agente contaminante dos cemitérios (Nascimento, 2020). Esse líquido apresenta coloração castanho-acinzentada, cheiro desagradável, elevada demanda bioquímica de oxigênio e graus variados de patogenicidade (Afangideh; Udokpoh, 2022; Crisanto-Perrazo et al., 2022). O necrochorume tem densidade média de 1,23 g/cm³, altos valores de condutividade e variação do pH entre 5 e 9. Sua composição é de aproximadamente 60% de água, 30% de substâncias mineralizadas e 10% de substâncias orgânicas e metais (Pereira, 2017).

Entre os compostos orgânicos presentes no necrochorume, estão as aminas biogênicas cadaverina (1,5-pentanodiamina) e putrescina (1,4-butanodiamina), produzidas pela descarboxilação dos aminoácidos livres (lisina e arginina/ornitina, respectivamente) (Figura 1). Essas aminas podem ser altamente tóxicas e cancerígenas e, quando degradadas, geram íons amônia (NH₄⁺) (Pegg, 2013; Nascimento, 2022).

Figura 1. Fórmulas estruturais dos aminoácidos Lisina (precursor da cadaverina), Arginina e Ornitina (precursores da putrescina) e das aminas biogênicas Cadaverina e Putrescina.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A problemática em relação ao necrochorume se deve à sua composição, que favorece a sobrevivência de microrganismos patogênicos, naturalmente presentes em cadáveres. Conforme as condições ambientais, esse líquido pode contaminar o solo e águas subterrâneas próximas às áreas cemiteriais, causando problemas de contaminação ambiental e para a saúde humana (Da Silva; Marques, 2017; Gonçalves et al, 2022).

Esse fluido cadavérico introduz no ambiente, por lixiviação, xenobiontes, que podem interagir, de forma indesejada, com substâncias do solo ou da água (Neckel et al., 2017; Nascimento, 2020). Essas interações podem tornar essas substâncias ainda mais tóxicas, aumentando o potencial de contaminação das mesmas e causando danos irreversíveis aos sistemas biológicos do local (Ferreira et al., 2021).

3.3 Invertebrados terrestres como bioindicadores

As alterações da microfauna do solo refletem em mudanças na vegetação e nas próprias condições da qualidade biológica do solo (Li et al., 2021; Rangel, 2022). A utilização de organismos edáficos como bioindicadores da qualidade do solo está relacionada com a sua sensibilidade a perturbações antrópicas; à sua associação com funções pré-estabelecidas do solo; e por representar, muito bem, a biota ambiental (Rieff, 2014; Wang et al., 2022). Por essas características, esses organismos são considerados ferramentas importantes a serem usadas na avaliação e monitoramento de impactos do solo, pois estão associados a processos de decomposição e ciclagem de nutrientes desses ambientes (Machado, 2015; Vincent et al., 2018).

3.3.1 *Folsomia candida*

Colêmbolos (Hexapoda: Collembola) são microartrópodes importantes e abundantes da mesofauna do solo, que interagem com os processos físico-químicos do ecossistema, decompondo e mineralizando a matéria orgânica, fragmentando os componentes da serapilheira e da produção fecal do sistema (Ruggiero et al. 2015; Milano et al., 2018). Além disso, a presença de colêmbolos no solo indica, bem como controla, as atividades de decompositores primários, como bactérias e fungos,

e as atividades de decompositores secundários, como nematóides e protozoários (Brown et al., 2015; Yu et al., 2021; Salmon et al., 2021).

As comunidades de colêmbolos são compostas por organismos euedáficos, hemiedáficos e epiedáficos. Seguindo uma distribuição vertical, geralmente, os organismos epiedáficos são encontrados na serapilheira (mais superficiais); os hemiedáficos nas camadas intermediárias e os euedáficos nas camadas mais profundas do solo (Oliveira Filho; Baretta, 2016; Machado et al., 2019). Os diferentes morfotipos de colêmbolos podem estar associados às propriedades físicas e químicas do solo e às diferentes respostas às modificações antrópicas (Baretta et al., 2016; Rangel, 2022).

Os colêmbolos são sensíveis às mudanças das propriedades físicas e químicas do solo, pois estas alteram as características naturais dos micro-habitats (Malheiro et al., 2020). Essa sensibilidade é, então, utilizada para avaliar os níveis de contaminação de diferentes ambientes (Santos et al., 2018; Machado et al., 2019; Li et al., 2024). Nesse sentido, diversas comunidades de colêmbolos têm sido amplamente utilizadas como bioindicadores de ecotoxicidade de solos (Buch et al., 2016; Alves et al., 2018; Segat et al., 2020). Sterzyńska et al. (2018) corroboram as afirmações de sensibilidade dos colêmbolos para serem usados em avaliações ambientais e citam, ainda, que a abundância populacional, a riqueza de espécies e a presença quase universal desses organismos nos solos são também parâmetros relevantes a serem considerados na classificação desses organismos como importantes bioindicadores de alterações da qualidade de solo.

A espécie *F. candida* é a mais utilizada em estudos ecotoxicológicos (Martins et al., 2024), devido ao seu curto ciclo de vida, capacidade de reprodução partenogenética, além da padronização dos testes de fuga e reprodução serem previstos pela ISO (1999). Essas características tornaram essa espécie uma excelente ferramenta para avaliar diversos parâmetros individuais e populacionais em um único experimento (Souza, 2016).

O uso de colêmbolos como bioindicadores é mais frequente na avaliação da abundância e diversidade desses organismos em áreas afetadas (Twardowski et al., 2016; Ortiz et al., 2019). Em climas tropicais, têm sido realizados ensaios de curta duração, como os testes de reprodução e fuga, para avaliar a ação de pesticidas,

metais pesados, hidrocarbonetos e resíduos orgânicos (Niemeyer et al., 2017; Menta; Remelli, 2020; Salmon et al., 2021; Lopes et al., 2024).

3.3.2 *Enchytraeus crypticus*

Enquitreídeos são anelídeos (Oligochaeta) da mesofauna, que possui um papel importante na fragmentação e decomposição da matéria orgânica do solo (Pelosi; Römbke, 2018; Amorim et al., 2021). Esses organismos participam dos processos de aeração do solo e aumentam a agregação de partículas minerais e orgânicas nesses ambientes (Józefowska et al., 2020; Liu et al., 2022). Juntamente com as minhocas, os enquitreídeos são reconhecidos como excelentes indicadores de qualidade e manejo do solo (Pelosi; Römbke, 2016; Niva; Brown, 2019; Long et al., 2024).

A maioria dos enquitreídeos são hermafroditas, embora algumas espécies sejam partenogênicas ou se reproduzem por fragmentação; de pequeno porte, medindo entre 1 e 40 mm; e consumidores da matéria orgânica em decomposição e de microorganismos (Amorim et al., 2021). Os enquitreídeos têm uma capacidade limitada de movimento no solo, portanto, vivem nas camadas mais superficiais (0 a 10 cm), onde a matéria orgânica e a atividade biológica se concentram (Pelosi; Römbke, 2018).

Os enquitreídeos são frequentemente escolhidos como modelos padrão para avaliar o risco ambiental de diferentes compostos, devido à sua sensibilidade (Amorim et al., 2021). De acordo com Mendes et al. (2022), esses organismos vivem em contato próximo com a água retida nos poros do solo e ficam expostos à contaminação por via dérmica (usada para troca gasosa e absorção de água) e gastro-intestinal (ingestão de alimentos e partículas de solo).

Embora a utilização de enquitreídeos em testes laboratoriais ecotoxicológicos tem sido relatada há cerca de 50 anos, a padronização dos ensaios ocorreu há 20 anos, conforme apresentado nas diretrizes ISO 16387 (2024) e OECD 220 (2024). Estes protocolos recomendam o uso da espécie *E. crypticus*, por esta apresentar vantagens sobre *E. albidus*, como: o cultivo é feito em meio ágar; a espécie apresenta maior tolerância a diferentes propriedades do solo, como pH, textura e quantidade de matéria orgânica; o organismo apresenta alta taxa reprodutiva, um

período reprodutivo mais curto e, conseqüentemente, período de teste mais curto (Niva; Brown, 2019; Mendes et al., 2022).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os ensaios biológicos do presente estudo foram desenvolvidos no Laboratório de Mutagênese Ambiental, lotado na Central de Recursos Microbianos (CRM), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus Rio Claro/SP, Brasil.

4.1 Simulação do processo de decomposição

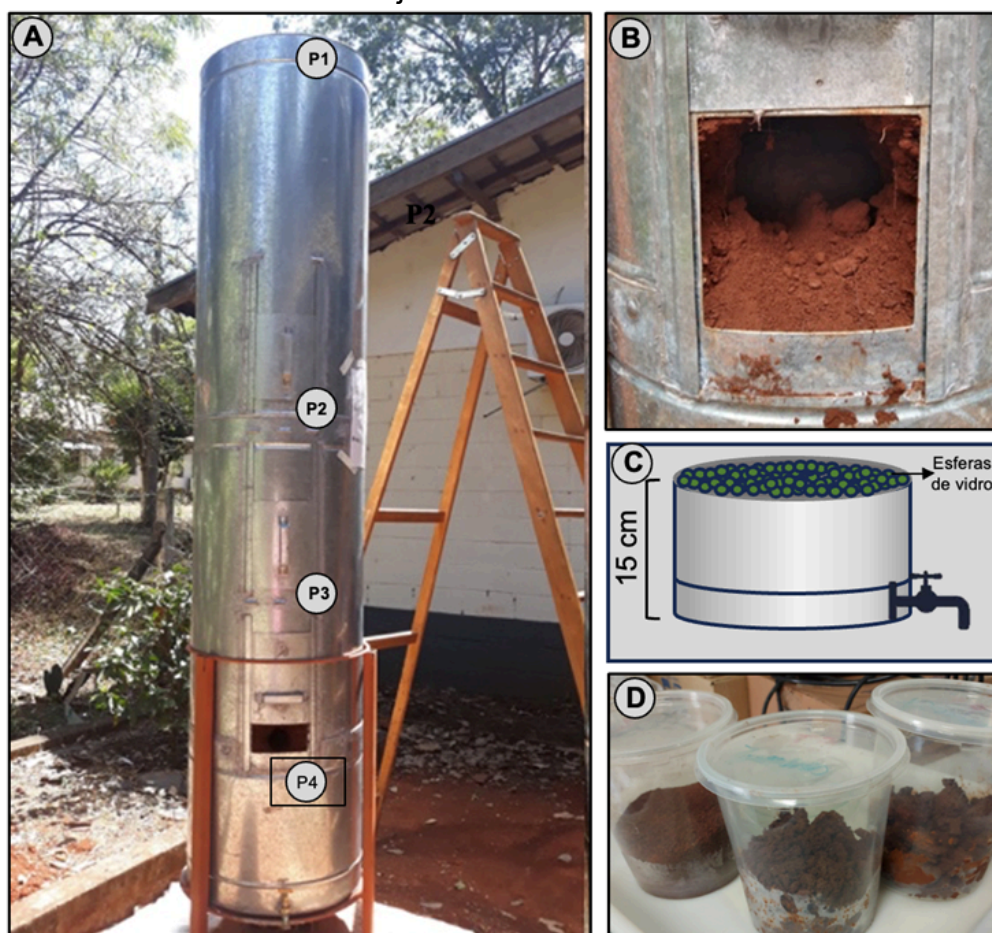
Em agosto de 2019, foi montado, pelo mesmo grupo de pesquisa do presente estudo, um modelo miniaturizado para acompanhamento dos processos de decomposição cadavérica, que acontece em ambientes de cemitérios. A estrutura montada se caracteriza por um cilindro de aço galvanizado de 2 m de altura por 0,5 m de diâmetro, instalada no Jardim Experimental da Unesp, campus de Rio Claro/SP. Essa estrutura foi preenchida, nos seus primeiros 15 cm da base, com esferas de vidro, para melhor drenagem dos líquidos derivados da decomposição da carcaça suína. Na sequência, o cilindro recebeu solo de referência (controle ambiental usado em outros ensaios com solo do mesmo grupo de pesquisa), até atingir cerca de 1,5 m do cilindro. A parte superior recebeu uma carcaça suína de, aproximadamente 11 kg, para simular uma inumação cadavérica. Após o posicionamento da carcaça, o espaço restante foi preenchido com o mesmo solo referência, até seu preenchimento total (2 m).

Passados dois anos e seis meses da primeira simulação, foi realizada uma nova inumação (26 de março de 2022) de carcaça suína de aproximadamente 10 kg, que seguiu a mesma metodologia, desta vez para simular uma recontaminação do solo, visto que os cemitérios possuem alta rotatividade de sepultamento, com reutilização das covas. Ambas as carcaças suínas foram adquiridas em um abatedouro licenciado para comercialização, dispensando a aprovação do experimento em comitê de ética em pesquisa.

A Figura 2, mostra a estrutura metálica utilizada para realizar a inumação da carcaça suína – *Sus scrofa* (A); indicação da posição da janela de coleta das amostras de solo (B); representação da base do tubo, preenchida, com cerca de 15 cm de esferas de vidro (bolinha de gude), com cerca de 1-1,5 cm de diâmetro, para reproduzir a região de granulação do solo e facilitar o fluxo dos líquidos gerados,

durante a decomposição da carcaça (C); e as amostras de solo coletadas (D). A estrutura cilíndrica (Figura 2A) foi fixada no chão do Jardim Experimental, por uma estrutura tipo tripé. O cilindro metálico é aberto na parte superior, para possibilitar a influência das variantes climáticas e pluviométricas, mas tem a sua base fechada, para impedir que o conteúdo lixiviado contamine o solo do local onde a mesma está instalada. O tubo possui ainda aberturas (janelas) ao longo de seu comprimento (Figura 2B), que foram instaladas a cada 50 cm, totalizando 3 janelas (0,50, 1,0 e 1,5 m acima da base do tubo), que foram utilizadas para a coleta de solo, nas diferentes profundidades da tubulação, para representar os diferentes estratos de solo contaminado com exsudados da carcaça, nos diferentes tempos da percolação.

Figura 2. Estrutura metálica usada para a inumação da carcaça suína e amostras coletadas nas janelas da estrutura metálica.



A. Estrutura de aço utilizada para o experimento de inumação da carcaça suína. Identificação dos pontos de coleta da estrutura; **P1.** Superfície do cilindro, com solo acima da carcaça suína; **P2.** Janela a 1,5 m da base do cilindro metálico; **P3.** Janela a 1 m da base do cilindro metálico; **P4.** Janela a 0,50 m da base do cilindro metálico; **B.** Vista ampliada de uma das janelas do tubo; **C.** Esferas de vidro na base do cilindro; **D.** Potes com amostras coletadas nas janelas do cilindro metálico. **Fonte:** Registrado pela autora (2022).

Para este estudo, foram coletadas amostras (Figura 2D) somente no quarto ponto (P4) da estrutura cilíndrica, visto que este ponto é o mais próximo da base onde ficam as esferas de vidro (local de retenção de necrochorume), o que favorece a avaliação dos compostos percolados. Foram avaliadas as amostras coletadas nos tempos T4 (coleta de 26/10/2022, correspondente a 7 meses, após a segunda inumação) e T5 (coleta de 30/01/2023, correspondente a 10 meses, após a segunda inumação).

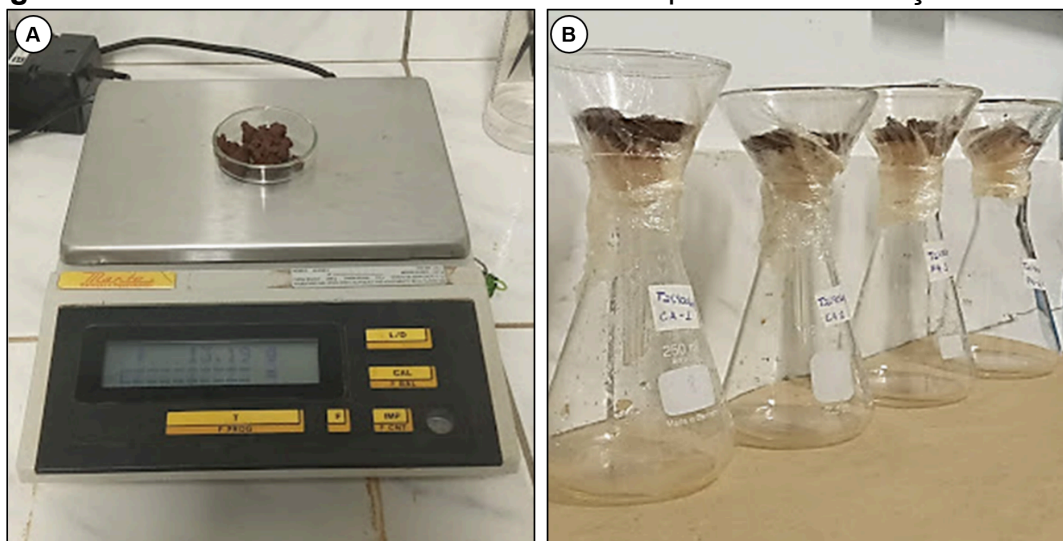
4.2 Solo Artificial Tropical (SAT)

Para conduzir os testes, foi utilizado o Solo Artificial Tropical (SAT), uma adaptação do solo artificial OECD (OECD, 1984). Este solo é composto por 75% de areia industrial fina, 20% de caulim e 5% de fibra de coco, seguindo as diretrizes estabelecidas na Norma ABNT NBR 15537 (2014). O solo SAT serviu como substrato para os ensaios de ecotoxicidade, sendo utilizado como um solo controle além do solo controle ambiental. A utilização do solo artificial se justifica pela sua padronização, visando eliminar possíveis interferências externas (Ferreira, 2021).

4.3 Cálculo da capacidade de retenção de água no solo (WHC)

O primeiro parâmetro a ser avaliado com o solo foi a sua capacidade de campo (máxima capacidade de água, que o solo é capaz de reter, após o excesso ter sido drenado), como representado pela Figura 3. Para isso, foram pesados, em placas de Petri, 10 g da amostra fresca do solo coletado (Figura 3A). Em seguida, o solo foi transferido para um funil forrado com algodão umedecido com 10 ml de água, até atingir a saturação. Esse solo saturado de água foi então coberto com filme plástico, para evitar a evaporação, e submetido a drenagem natural, por 24 horas (Figura 3B). Estes ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 3. Processamento das amostras de solo para a determinação da WHC.



A. Pesagem das amostras; **B.** Funil com solo saturado em repouso. **Fonte:** Registrado pela autora (2023).

Após esse intervalo, as amostras foram retiradas dos funis e pesadas (peso úmido). Na sequência, as amostras foram secas em estufa a 105 °C, por 24 horas e, após esse período, resfriadas em dessecador, sendo novamente pesadas (peso seco). A capacidade de retenção de água foi então determinada como a porcentagem de massa seca.

4.4 Análise química das amostras

A determinação do potencial hidrogeniônico (pH) das amostras de solo foi conduzida no Laboratório de Mutagênese Ambiental, utilizando um eletrodo combinado (pHmetro). Para isso, foi preparada em um béquer uma solução (1:2,5, com 10 g de solo e 25 ml de solução de KCl a 1M (Teixeira et al., 2017). A amostra foi agitada com um bastão de vidro por, aproximadamente, 60 segundos e, em seguida, deixada em repouso, por 2 horas antes da leitura.

As análises químicas das amostras de solo, que envolviam os níveis de fósforo (P), cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn), chumbo (Pb) e ferro (Fe), foram realizadas no Centro de Estudos Ambientais (CEA-UNESP/Rio Claro), sob a supervisão do Prof. Dr. Amaurí Menegário. Este estudo tinha como objetivo avaliar possíveis contaminações metálicas provenientes da estrutura utilizada para a simulação de inumação.

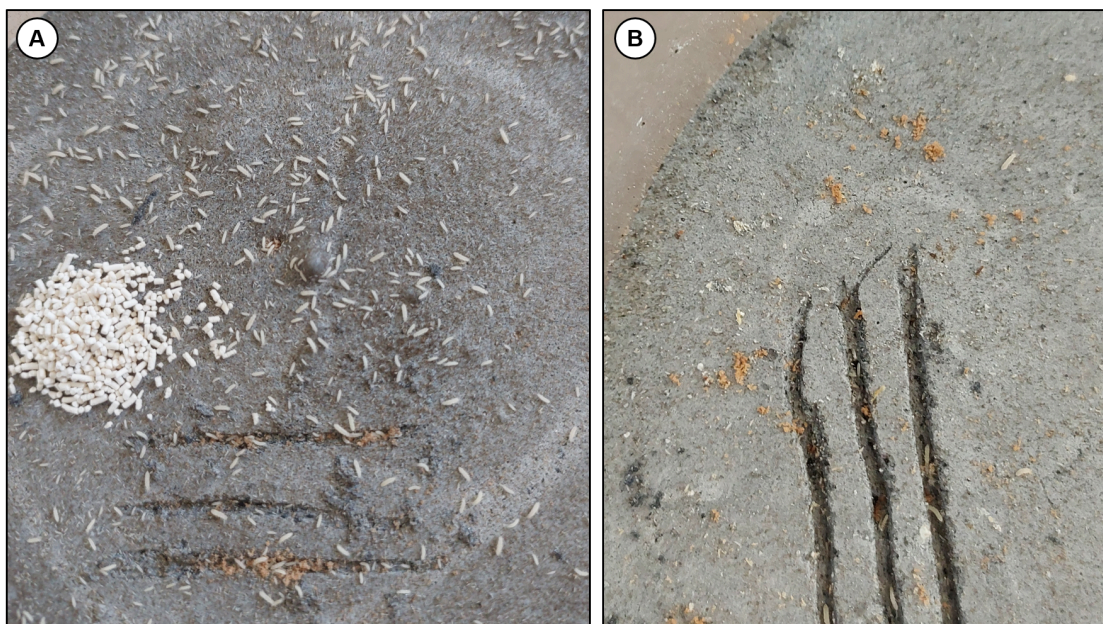
A identificação dos compostos presentes nas amostras de solo foi conduzida pela técnica de espectrometria de massa, com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Para essa determinação, foram colocados, aproximadamente, 0,5 g de solo em frascos de digestão e adicionados a eles 2 ml de ácido nítrico (HNO₃) concentrado. Na sequência, as amostras foram digeridas em forno de micro-ondas, de acordo com o protocolo EPA 3015A (Element, 2007). As amostras digeridas foram diluídas para um volume final de 50 ml com água ultrapura na proporção adequada (1:10 v/v), para serem realizadas as determinações das concentrações dos metais.

4.5 Manutenção dos invertebrados bioindicadores

4.5.1 Manutenção dos colêmbolos

Os organismos foram cultivados em laboratório em recipientes de polipropileno, nos quais foi utilizado um substrato composto por uma mistura de 500 g de gesso para argamassa (pH 6,4), 50 g de carvão em pó ativado quimicamente (pH entre 6 e 7) e 300 mL de água de osmose reversa, conforme especificado na norma técnica ABNT NBR ISO 11267-2011 (Figura 4). Os colêmbolos foram alimentados com fermento biológico seco (*Saccharomyces cerevisiae*), duas vezes por semana (Figura 4A) e o meio foi umedecido com água, quando necessário. Os recipientes foram mantidos em estufa, a uma temperatura de 20 °C ± 2, com fotoperíodo de 16h claro/8h escuro. Para garantir a uniformidade da idade dos indivíduos, durante os testes ecotoxicológicos, quando os ovos dos adultos adquiriram coloração amarronzada (Figura 4B), eles foram transferidos para recipientes separados, para facilitar o acompanhamento da eclosão, (processo de sincronização). Após a eclosão, os organismos foram observados por um período de 10 a 12 dias, até atingirem a fase adulta, para serem utilizados no teste. Para a renovação e manutenção do cultivo desses organismos no laboratório, é necessário que, a cada dois meses, eles sejam transferidos para novos meios de cultivo.

Figura 4. Cultivo dos colêmbolos em laboratório.



A. Organismos adultos alimentados com fermento biológico seco; **B.** Destaque para os ovos amarronzados a serem recolhidos para sincronização. **Fonte:** Registrado pela autora (2023).

4.5.2 Manutenção dos enquitreídeos

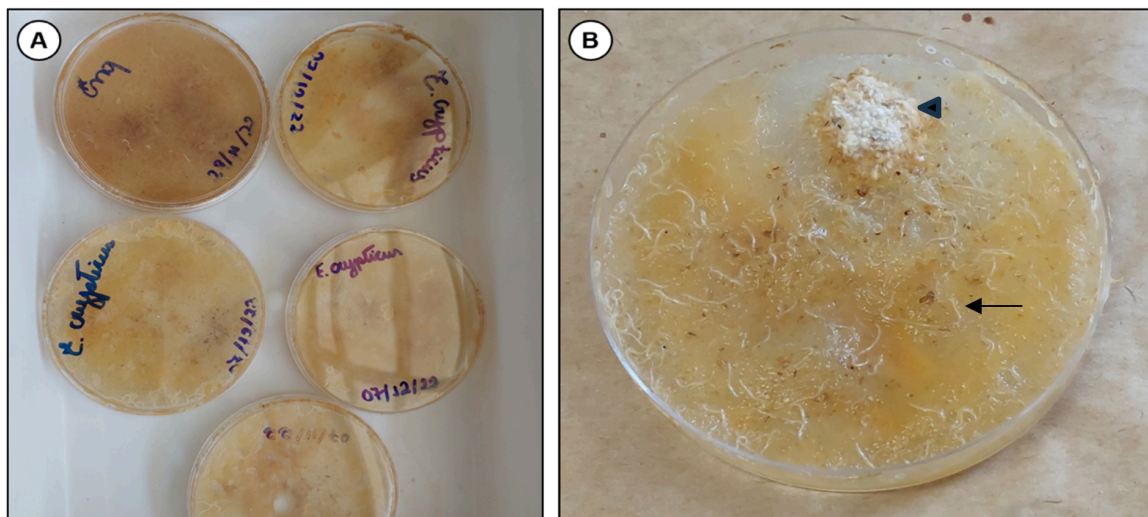
Os organismos foram cultivados em placas de Petri, com meio preparado com ágar nutritivo, de acordo com as especificações das normas ABNT NBR ISO 16387 (2012), onde se incluiu 13,6 gramas de ágar bacteriológico, 6 ml de solução de bicarbonato de sódio 0,1M (NaHCO_3), 6,4 ml de solução de cloreto de potássio 0,01M (KCl) e 772 ml de água ultrapura, totalizando 800 ml de meio.

A dissolução do ágar foi realizada em uma chapa aquecedora, a 250 °C. Na sequência, o meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C, por 20 minutos. Após este processo, o meio foi deixando em temperatura ambiente, até atingir 60 °C, quando foram adicionados 8 ml de solução de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 8 ml de sulfato de magnésio (MgSO_4). Finalizado o preparo, o meio foi distribuído nas placas de Petri para se solidificar. As placas foram envoltas em parafilm e armazenadas a 4 °C \pm 2, até a sua utilização.

O cultivo foi realizado em uma estufa regulada a 20 °C \pm 2, fotoperíodo de 16h claro/8h escuro. Durante esse período, os organismos foram alimentados duas vezes por semana com farinha de aveia e a umidade do meio foi ajustada com água de osmose reversa. A cada trimestre, os organismos foram transferidos para novos

meios de cultivo, o que assegurou a manutenção da espécie no laboratório (Figura 5).

Figura 5. Cultivo de *E. crypticus* em laboratório.



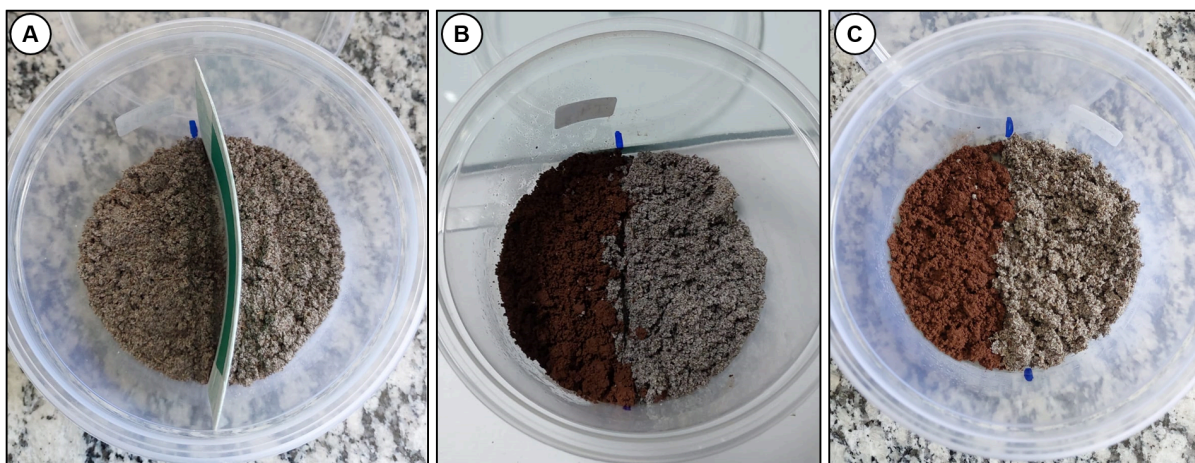
A. Placa de Petri com o cultivo; **B.** Destaque dos organismos alimentados com farinha de aveia.
Fonte: Registrado pela autora (2023).

4.6 Ensaios de ecotoxicidade com *Folsomia candida*

4.6.1 Teste de comportamento de fuga

Os ensaios ecotoxicológicos de comportamento de fuga foram conduzidos em quintuplicata, de acordo com a norma ISO 17512-2 (2011). Para a montagem dos experimentos, foram utilizados recipientes de plástico (12 cm de diâmetro e 8 cm de altura), divididos ao meio por uma separação plástica inserida verticalmente, conforme apresentado pela Figura 6. Cada um dos lados recebeu 30 g de solo com pH e umidade corrigidos. Um dos lados do recipiente recebeu o solo controle e o outro lado as respectivas amostras do solo coletado no tubo da inumeração. Os testes controles foram montados com solo SAT em ambos os lados (controle duplo) (Figura 6A). A divisória plástica foi então retirada e 10 indivíduos, com idade entre 10 e 12 dias, foram colocados sobre a linha da divisão formada (6B), que foi desfeita logo a seguir (6C). Os recipientes permaneceram tampados, em ambiente com temperatura controlada de $20\text{ °C} \pm 2$. O teste teve a duração de 48 horas e os indivíduos, neste período, não receberam alimentação.

Figura 6. Etapas de montagem do teste de comportamento de fuga.



A. Inserção do solo no recipiente dividido; **B.** Retirada da divisória e “trincheira” formada, onde foram distribuídos os organismos; **C.** Recipientes após inserção dos organismos, divisão desfeita. **Fonte:** Registrado pela autora (2023).

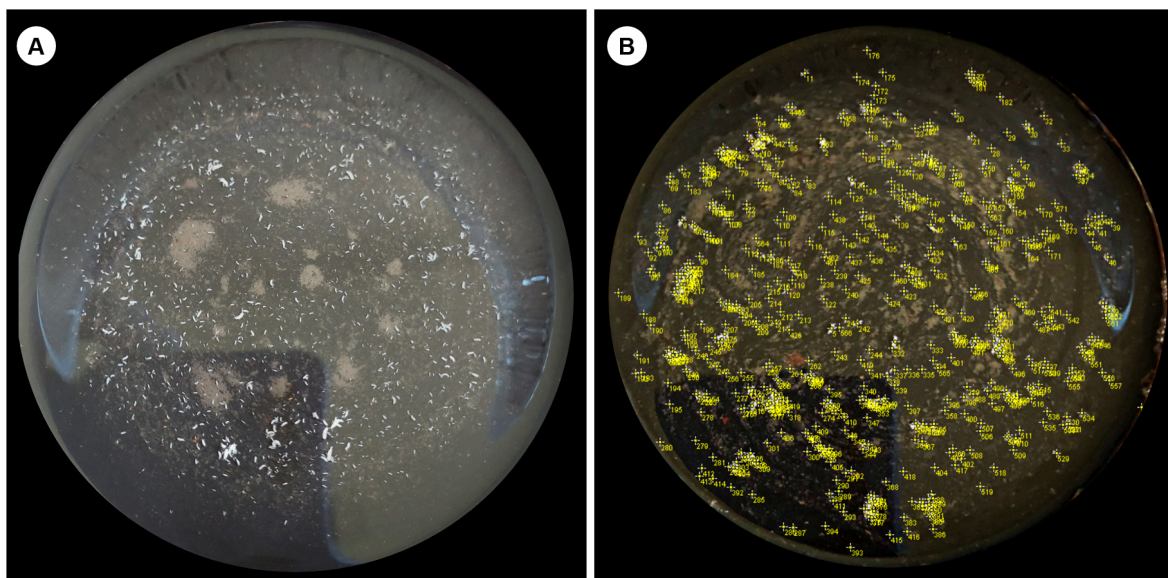
Após 48h, a divisória foi novamente inserida verticalmente no centro do recipiente, separando em duas seções (solo contaminado e solo controle). O solo de cada lado do experimento foi individualizado, adicionando água e tinta de carimbo hidrossolúvel para que os organismos ficassem suspensos e em destaque na imagem. Foi então fotografado e contabilizado o número de indivíduos de cada lado do recipiente. Para a validação do teste de comportamento de fuga, os recipientes do controle negativo (preenchidos de ambos os lados com o solo de referência) precisavam apresentar distribuição homogênea (40 a 60%) e mortalidade inferior a 20% (ISO 17512-2, 2011).

4.6.2 Toxicidade crônica: Teste de reprodução

Os ensaios ecotoxicológicos de reprodução foram baseados na norma ABNT NBR ISO 11267 (2011). Foram preparadas cinco réplicas de cada concentração e 8 réplicas de cada controle (solo natural e SAT). Antes dos experimentos, foram retiradas amostras do solo para aferição de pH. Para a realização dos ensaios ecotoxicológicos, o solo coletado foi corrigido para as condições ideais de pH $6,0 \pm 0,5$ (apenas SAT) e de umidade (50% da capacidade máxima de retenção de água, utilizando quantidades suficientes de água de osmose reversa e carbonato CaCO_3), conforme previsto nas normas. Esses parâmetros foram avaliados no início e no final do ensaio.

Amostras (30 g) do solo referência e das respectivas amostras do solo do tubo da inumação foram dispostas em recipientes de vidro (5 cm de diâmetro e 9 cm de altura), onde foram distribuídos 10 colêmbolos, com idade entre 10 e 12 dias. Foram também adicionados, em cada recipiente, no início e após 14 dias, aproximadamente 2 mg de fermento como fonte de alimento. O teste teve duração de 28 dias e, após esse período, o conteúdo de cada recipiente foi transferido para outro frasco maior, onde foi adicionado água. O conteúdo foi homogeneizado com a ajuda de uma espátula, para manter os colêmbolos na superfície da água. Em seguida, foram adicionadas algumas gotas de nanquim preto hidrossolúvel (Acrilex) na água, para que o contraste entre os organismos e o líquido permitisse maior visibilidade dos organismos, bem como para fotodocumentação de melhor qualidade (Figura 7A). Após esse processo, foram realizadas as contagens dos adultos e juvenis, pelo software ImageJ (Figura 7B).

Figura 7. Finalização do teste de reprodução com *Folsomia candida*.



A. Contraste dos organismos na água corada com nanquim; **B.** Contagem dos indivíduos no software ImageJ. **Fonte:** Registrado pela autora (2023).

Para que o ensaio de reprodução de colêmbolos seja validado, a letalidade dos adultos dos testes controles não deve exceder 20%, ao final do experimento. Além disso, a taxa de reprodução deve atingir um mínimo de 100 juvenis por recipiente-controle e o coeficiente de variação da reprodução nesses controles não deve exceder 30%.

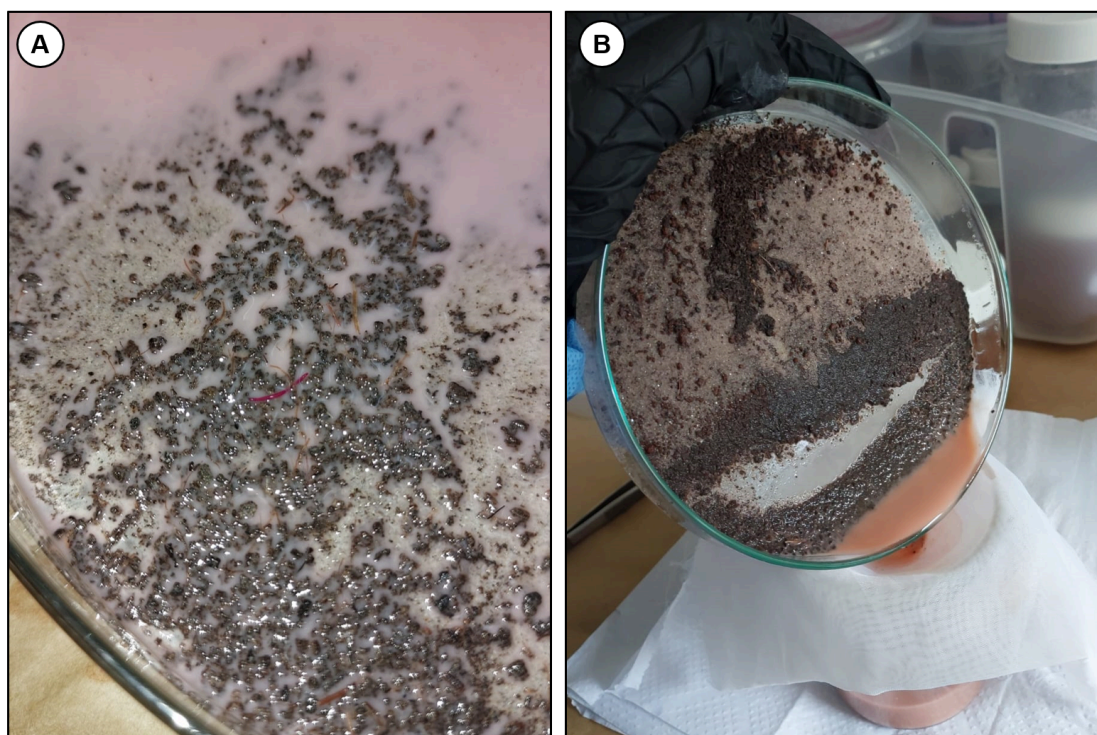
4.7 Ensaio de ecotoxicidade com *Enchytraeus crypticus*

Os procedimentos adotados nos testes de reprodução e fuga com *E. crypticus* foram baseados na norma ABNT NBR ISO 16387 (2012) e ISO 17512-1 (2011), respectivamente. As amostras utilizadas foram as mesmas descritas no item 4.5, para colêmbolos (P4 coletado aos 7 meses e 10 meses após a segunda inumação).

4.7.1 Teste de comportamento de fuga

Os ensaios de fuga foram realizados com oito réplicas para os controles (solo natural e SAT) e cinco réplicas para os tratamentos. As exposições foram preparadas em frascos de polipropileno (12 cm de diâmetro e 8 cm de altura), contendo 30 g de solo referência em um lado da divisória e 30g das amostras dos diferentes pontos de coleta do tubo da inumação do outro lado. Dez indivíduos adultos, com clitelos bem desenvolvidos e visíveis, foram distribuídos nos frascos, os quais foram mantidos em incubadora, em temperatura entre 18 e 22 °C e fotoperíodo de 16h claro/8h escuro, por 48 h. Após o período de exposição, foi realizada a remoção cuidadosa do solo em cada lado da divisória e a contagem manual dos indivíduos fixados e corados em solução alcoólica de Rosa de Bengala 1%. Para a finalização do teste de fuga com *E. crypticus*, o solo de cada lado do recipiente foi solubilizado em água, para permitir a melhor visualização dos organismos corados (Figura 8A) e, quando necessário, o líquido foi filtrado em voal, onde os organismos ficaram retidos (Figura 8B).

Figura 8. Teste de fuga com *E. crypticus*.

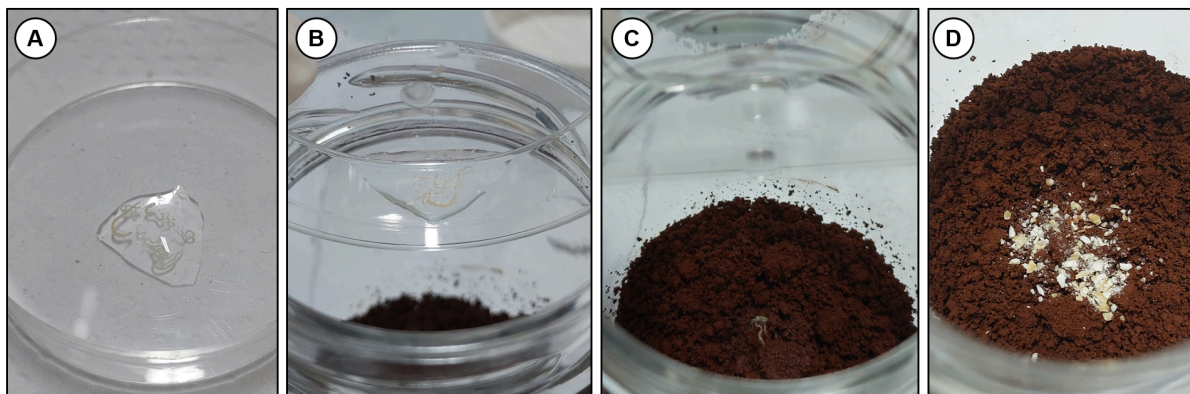


A. Organismos corados em solo SAT; **B.** Filtragem do solo solubilizado para retenção dos organismos. **Fonte:** Registrado pela autora (2024).

4.7.2 Toxicidade crônica: Teste de reprodução

Os ensaios ecotoxicológicos de reprodução foram realizados por 21 dias, nas condições citadas no item 4.6.2, como apresentado na Figura 9. No início do teste, 10 indivíduos clitelados (Figura 9A) foram adicionados em 30 g de solo (Figura 9B-C). Aproximadamente 50 mg de farelo de aveia foram adicionados como fonte de alimento (Figura 9D), e a mesma quantidade foi readicionada na metade do experimento. Os frascos foram abertos uma vez por semana, para permitir a aeração do sistema; o ajuste da umidade, que foi feito pela adição de água de osmose reversa; e para repor o alimento, quando necessário. Após o período de exposição, foi realizada a remoção e contagem manual dos indivíduos adultos e juvenis, que foram, previamente, fixados e corados em solução alcoólica de Rosa de Bengala 1%.

Figura 9. Etapas de montagem do teste ecotoxicológico de reprodução.



A. Separação dos organismos adultos (clitelados); **B.** solo separado para o experimento; **C.** Solo com os organismos adicionados; **D.** Adição de alimento no sistema (farelo de aveia). **Fonte:** Registrado pela autora (2023).

Para que os experimentos sejam validados, o número médio de juvenis deve ser maior que 25 por recipiente-teste, assumindo-se que no início do ensaio foram adicionados 10 adultos, com ovos na região do clitelo. Além disso, o coeficiente de variação entre as réplicas não deve ultrapassar 50%.

4.8 Análises estatísticas dos resultados

4.8.1 Teste de reprodução

Os dados gerados no teste de reprodução foram avaliados pelo Teste de Shapiro-Wilk, para avaliar a normalidade dos dados, e Teste de Bartlett, para avaliar a homogeneidade da variância. Nos casos em que os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância foram atendidos, foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnett, utilizando o SAT como grupo controle. Quando os dados não atenderam aos critérios de normalidade e homogeneidade de variância, foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. A significância estatística foi determinada com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas pelo software R 4.2.1 (R Core Team, 2023).

4.8.2 Teste de fuga

Os testes de comportamento de fuga foram avaliados pela equação abaixo (ISO, 2011):

$$TF \frac{\text{N}^\circ. \text{ de organismos (solo controle)} - \text{N}^\circ. \text{ de organismos (solo teste)}}{\text{Número total de organismos}}$$

Quando os resultados apresentam valores negativos, é considerado que não houve fuga. Quando os valores são positivos, é realizado o teste exato de Fisher, utilizando o teste bicaudal para o controle duplo e o teste unicaudal para a combinação de solos contaminados e solo controle (Alves et al., 2015). O teste unicaudal é utilizado para avaliar a resposta de fuga. Neste caso, a hipótese nula assume que metade dos indivíduos permanece no solo contaminado e a outra no solo controle. Para os testes duplos (solo controle/controle), é indicado teste bicaudal. Já para esse teste, a hipótese nula assume uma distribuição igual de organismos em ambos os lados de cada recipiente de teste. As hipóteses nulas são rejeitadas para *p-value* iguais ou inferiores a 0,05 (Da Luz et al., 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise química das amostras

Os resultados da análise química realizada com as amostras de solo, para a coleta realizada aos 7 meses e 10 meses da segunda inumação, estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Quantificação dos parâmetros químicos das amostras de solo.

	pH	P (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Fe (mg/kg)
CA	4,79	591 ± 32	536 ± 19	79 ± 4	73 ± 2	15 ± 0,2	105930 ± 1146
7 meses	4,19	556 ± 56	562 ± 34	90 ± 7	138 ± 9	13 ± 0,5	102448 ± 3014
10 meses	3,99	534 ± 8	445 ± 13	87 ± 3	167 ± 3	12 ± 1	107759 ± 2888

CA. Controle ambiental; **7 meses.** Amostra do ponto 4 coletada aos 7 meses; **10 meses.** Amostra do ponto 4 coletada aos 10 meses; **P.** fósforo; **Mn.** Manganês; **Cu.** Cobre; **Zn.** Zinco; **Pb.** Chumbo; **Fe.** Ferro. **Fonte:** Elaborado pela autora (2024).

Pelas análises químicas, os solos utilizados para inumação (CA), assim como os solos que receberam necrochorume, após 7 e 10 meses, são de natureza ácida (pH inferior a 7). Além do pH, fatores como a capacidade de troca catiônica e a composição mineralógica desempenham papel importante na dinâmica de disponibilidade e toxicidade de metais no solo (Oliveira, 2019) e, em geral, os solos ácidos retêm mais metais (Zanatta; Pires, 2024).

As concentrações dos elementos inorgânicos (cobre, zinco e chumbo) estão dentro dos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 420/09, sendo considerados atóxicos nas concentrações detectadas para os solos. Os demais elementos não possuem valores de referência propostos pela legislação.

Os altos teores de ferro registrados nas amostras de solo, semelhantes aos do solo de referência, podem ser atribuídos às propriedades ferrosas do solo utilizado. Portanto, com base nestes resultados, não houve influência da estrutura

metálica utilizada no presente estudo, sobre a decomposição da carcaça suína inumada.

5.2 Ensaios de ecotoxicidade com *E. crypticus*

5.2.1 Teste de reprodução

Na Tabela 2, estão apresentados os valores de pH, medidos no início e no final do experimento de reprodução, para cada unidade experimental. As medições de pH inicial e final apresentaram diferenças, mas essas não comprometeram a integridade do ensaio, ao longo dos 21 dias. O monitoramento constante desses valores é necessário, pois os organismos são suscetíveis a alterações no pH, principalmente em solos alcalinos, fator este que pode impactar negativamente a reprodução (Martins, 2020). De acordo com estudos de Oliveira et al. (2015), o pH do solo tropical pode variar de 5,0 a 6,5.

Tabela 2. Valores de pH medidos no solo contaminado, no início e no final do teste de reprodução.

Tratamentos	<i>Enchytraeus crypticus</i>	
	pH inicial	pH final
CA	4,79	5,84
SAT	6,34	6,80
7 meses	4,16	4,79
10 meses	3,99	4,55

CA. Controle ambiental; **SAT.** Solo artificial tropical; **7 meses.** Amostra do ponto 4 coletada aos 7 meses; **10 meses.** Amostra do ponto 4 coletada aos 10 meses. **Fonte:** Elaborado pela autora (2024).

O resultado do teste de toxicidade crônica (reprodução), realizado com *E. crypticus* expostos ao solo contaminado por necrochorume, está apresentado na Tabela 3. Esta tabela exhibe o número médio de organismos, por tempo coletado, bem como o coeficiente de variação das replicatas. De acordo com a norma ISO 16387 (ABNT, 2012), o número médio de juvenis deve ser maior que 25 indivíduos/recipiente-teste e o coeficiente de variação deve permanecer abaixo de 50%, para que o teste seja válido. Portanto, pelos resultados, o teste pode ser considerado válido.

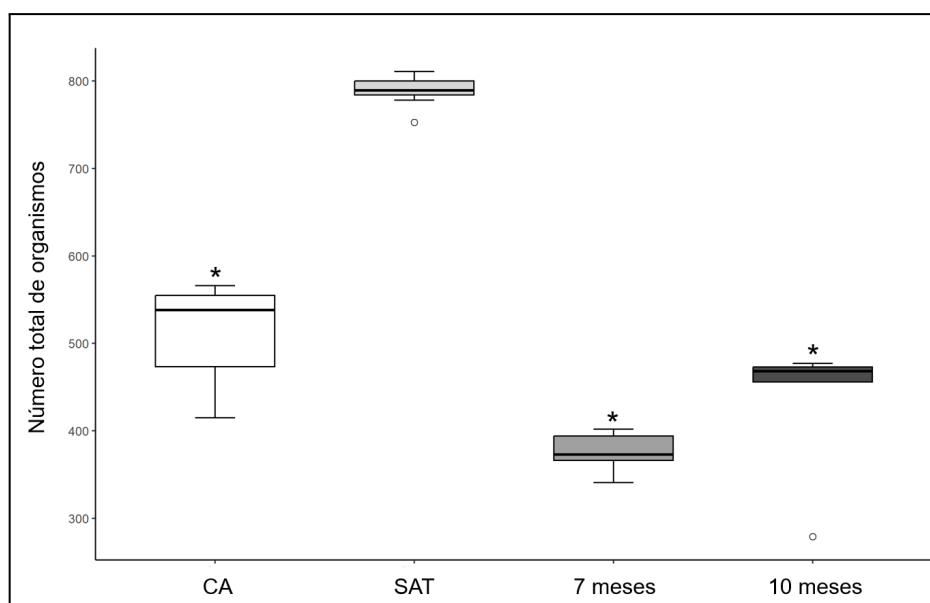
Tabela 3. Resultados dos dados obtidos no teste de reprodução com *E. crypticus*, submetidos a solos contaminados com necrochorume, coletados em dois diferentes tempos, após a segunda inumação.

Solo contaminado por necrochorume	<i>Enchytraeus crypticus</i>	
	Número médio de organismos	Coefficiente de variação (%)
SAT	789,125	2,34
Controle Ambiental	512	11,26
7 meses	375,2	6,43
10 meses	430,6	19,77

CA. Controle ambiental; **SAT.** Solo artificial tropical; **7 meses.** Amostra do ponto 4 coletada aos 7 meses; **10 meses.** Amostra do ponto 4 coletada aos 10 meses. **Fonte:** Elaborado pela autora (2024).

Na Figura 10, estão expressos os números médios de organismos coletados de testes realizados, por 21 dias, com solos contaminados com necrochorume, por dois tempos diferentes (7 e 10 meses), após a segunda inumação. Pelos resultados das análises estatísticas, foi observado que todos os solos avaliados (CA, solo de 7 e 10 meses, pós inumação), apresentaram valores de p estatisticamente significativos, em relação ao SAT.

Figura 10. Resultado do teste de toxicidade do necrochorume, para a reprodução de *E. crypticus*.



CA. Controle ambiental; **SAT.** Solo artificial tropical; **7 meses.** Amostra do ponto 4 coletada aos 7 meses; **10 meses.** Amostra do ponto 4 coletada aos 10 meses. * Estatisticamente significativo em comparação ao SAT ($p < 0,05$), por meio do teste de Kruskal-Wallis/Dunn. **Fonte:** Elaborado pela autora (2024).

De acordo com os dados da tabela 3, não foram observados níveis de letalidade crônica nas amostras testadas. Pelos resultados, pode-se inferir que os organismos continuaram a se reproduzir, em ambas as amostras contaminadas com necrochorume, porém com eficiência reprodutiva diminuída, o que demonstra uma sensibilidade de *E. crypticus* aos contaminantes. Com base nos resultados apresentados, é possível constatar o aumento do número de juvenis na amostra coletada aos 10 meses da segunda inumação, em relação à amostra coletada aos 7 meses. Esses dados sugerem que pode ter havido uma maior biodegradação por atenuação natural na amostra de 10 meses, que proporcionou uma diminuição da toxicidade de compostos advindos do necrochorume.

No estudo realizado por Szelecz et al. (2016), que investiga os impactos da decomposição de carcaças suínas sobre as comunidades de nematóides do solo, foi observado que a presença dos cadáveres suínos influenciou, de maneira significativa, os índices de diversidade e riqueza de espécies desses invertebrados. Nesse caso, houve uma acentuada redução na diversidade e riqueza de espécies nos locais próximos às carcaças em decomposição. Com base no estudo citado, é possível afirmar que o processo de decomposição de carcaças suínas altera, consideravelmente, a composição da fauna do solo, reduzindo o número de indivíduos na área contaminada.

O fato de o controle ambiental ter apresentado diferença significativa em relação ao SAT, pode estar relacionado ao seu pH, que é notoriamente mais ácido e este não foi corrigido, como no SAT. Contudo, apesar dos pH dos solos naturais serem semelhantes entre si, os organismos apresentaram uma taxa de reprodução superior no controle ambiental, em comparação aos solos contaminados por necrochorume (7 meses e 10 meses).

De acordo com Rai et al. (2022), o vazamento de necrochorume provoca alterações significativas na química do solo, principalmente, no pH. De modo geral, no início do processo de decomposição de mamíferos, ocorre a alteração do pH do solo, devido ao acúmulo de íons de amônia (NH_4^+), que são gerados pela amonificação das proteínas, durante os processos de autólise e putrefação, predominantemente, nas etapas de inchaço corporal e decomposição ativa. Nos estágios finais da decomposição, o pH do solo contaminado por necrochorume se torna mais ácido, conforme descrito por Szelecz et al. (2018). Luo et al. (2014)

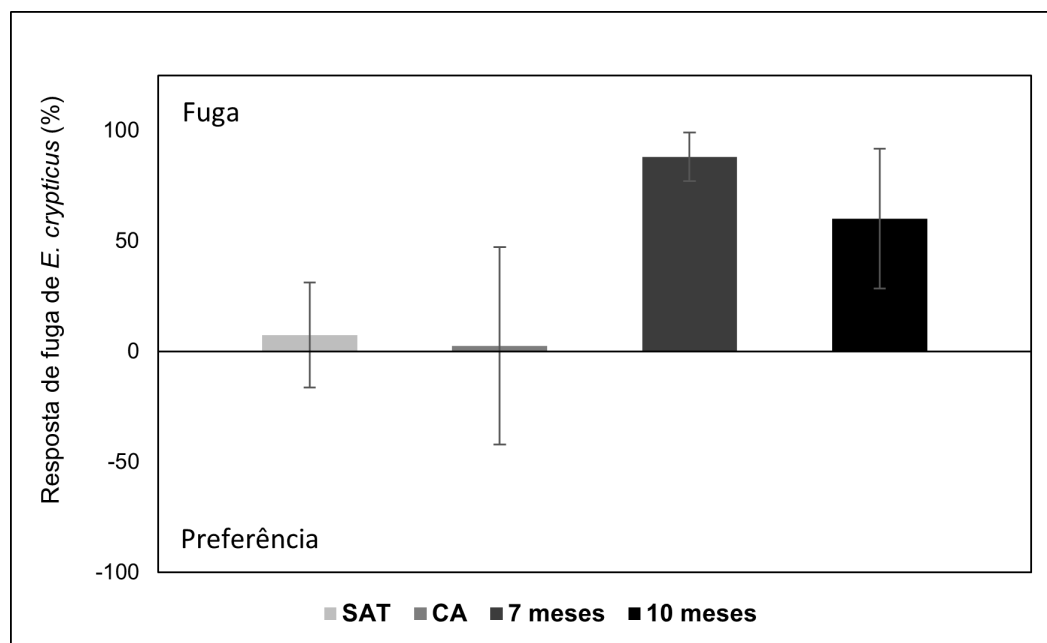
observaram que efeitos negativos sobre a reprodução de *E. crypticus* são mais evidentes em solos ácidos, o que corrobora com os resultados observados no presente estudo. Assim, a reprodução desses organismos pode ter sido afetada não somente pela toxicidade do necrochorume, mas também pelo pH ácido do solo.

5.2.2 Teste de fuga

Os resultados dos ensaios de fuga com *E. crypticus*, expostos aos solos contaminados por necrochorume por 48h, estão expressos na Figura 11. O valor do p, de todas as amostras, foi estatisticamente significativo ao nível de 5%. Os testes apresentaram os critérios de validação especificados na Norma ISO 17512-1 (2011), onde a distribuição dos indivíduos nos controles foi homogênea, se mantendo na faixa de 40 a 60%, para cada lado, e a mortalidade dos enquitreídeos foi inferior a 10%.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, os organismos, expostos por 48 horas aos solos contaminados com necrochorume, exibiram comportamento de fuga, para as duas amostras analisadas. Especificamente para o organismo *E. crypticus*, foi observada uma maior rejeição ao solo coletado 7 meses após a segunda inumação. Esse comportamento corrobora os dados anteriormente descritos para toxicidade de reprodução, para a maior toxicidade desta amostra, em comparação à amostra obtida meses depois. Essa semelhança entre os resultados dos testes de fuga e de reprodução reforça a hipótese de que a amostra coletada aos 7 meses apresentou maior ecotoxicidade, podendo indicar uma menor sensibilidade dos enquitreídeos aos efeitos tóxicos do necrochorume nessa amostra.

Figura 11. Porcentagem de fuga (média \pm desvio padrão) de enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*) expostos a solos contaminados com necrochorume após 7 e 10 meses da segunda inumação.



CA. Controle ambiental; **SAT.** Solo artificial tropical; **7 meses.** Amostra do ponto 4 coletada aos 7 meses; **10 meses.** Amostra do ponto 4 coletada aos 10 meses. **Fonte:** Elaborado pela autora (2024).

Os estudos realizados por Schlaghamerský e Krawczynski (2015), com enquitreídeos de locais impactados com contaminantes de decomposição de carcaças, mostraram uma grande influência da decomposição de carcaças sobre a toxicidade de solo. Durante o processo de decomposição, houve um aumento significativo nos níveis de pH, fósforo (na forma de fosfato) e nitrogênio (sob as formas de nitrato e amônio) sob a carcaça. Os autores observaram que estes parâmetros diminuíram à medida que aumentava a distância da carcaça. Nesta pesquisa, todos os enquitreídeos analisados mostraram uma clara preferência por se distanciar de solos com necrochorume, evidenciando uma correlação positiva com a distância e uma correlação negativa com o pH. Esses resultados sugerem que a decomposição cadavérica pode induzir um comportamento de fuga e rejeição do solo nas áreas próximas à carcaça. Essa observação é reforçada pelos resultados obtidos no presente estudo, que indicaram a tendência dos enquitreídeos de se afastarem dos solos contaminados por necrochorume.

5.3 Ensaio de ecotoxicidade com *F. candida*

5.3.1 Teste de reprodução

A Tabela 4 apresenta os valores de pH medidos no início e no final do experimento de reprodução, para cada unidade experimental. As aferições de pH inicial e final mostraram uma pequena variação do pH, entre esses dois tempos, que não comprometeu a integridade do ensaio ao longo dos 28 dias. Solos com pH superior a 7 podem limitar a disponibilidade de micronutrientes metálicos (Breda et al., 2020). Assim, os solos brasileiros, que são tipicamente de natureza ácida, podem ser mais suscetíveis à toxicidade, já que os metais ficam disponíveis para os organismos (Zanatta; Pires, 2024).

Tabela 4. Valores de pH medidos no solo contaminado, no início e no final do teste de reprodução.

Tratamentos	<i>Folsomia candida</i>	
	pH inicial	pH final
CA	4,48	4,86
SAT	6,50	6,77
7 meses	3,92	4,19
10 meses	3,96	4,30

CA. Controle ambiental; **SAT.** Solo artificial tropical; **7 meses.** Amostra do ponto 4 coletada aos 7 meses; **10 meses.** Amostra do ponto 4 coletada aos 10 meses. **Fonte:** Elaborado pela autora (2024).

Para avaliar a toxicidade de solos, é fundamental considerar o tipo do solo analisado, porque as suas propriedades podem influenciar os resultados dos bioensaios (Vasícková et al., 2016; Yang et al., 2018). O tipo de solo pode afetar a biodisponibilidade de nutrientes, devido a características como pH e matéria orgânica (Alves et al., 2018; Lin et al., 2019).

O resultado do teste de toxicidade do solo contaminado por necrochorume, utilizando o organismo *F. candida*, está apresentado na Tabela 5. Esta tabela exhibe o número médio de organismos por tempo coletado, bem como o coeficiente de variação das réplicas. De acordo com a Norma ISO 17512-2 (2011), a letalidade dos adultos dos testes controles não deve exceder 20%, a taxa de reprodução deve ser

maior que 100 juvenis por recipiente-controle e o coeficiente de variação da reprodução não deve exceder 30%, para que o teste seja validado. Pelos resultados obtidos no presente estudo, o teste foi considerado validado.

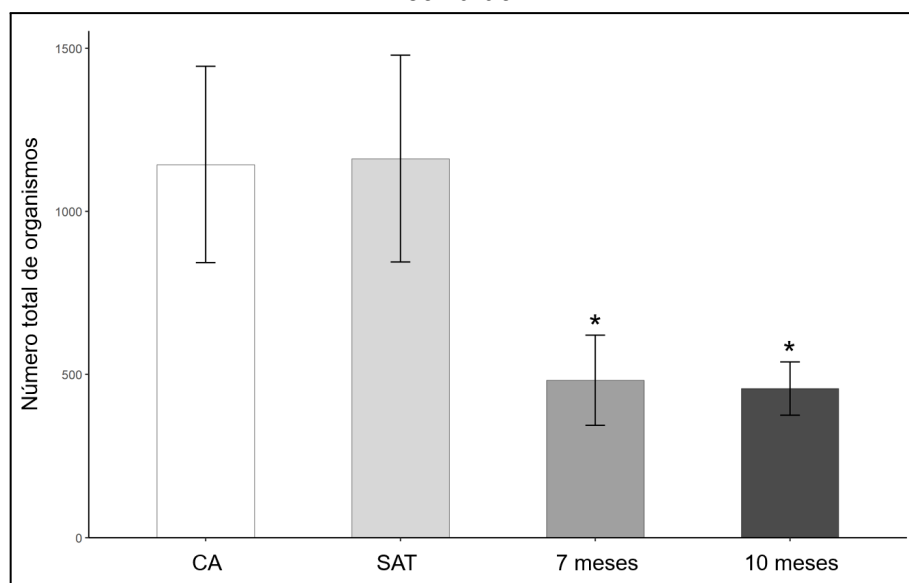
Tabela 5. Resultado do teste da toxicidade do necrochorume na reprodução de *F. candida*.

Solo contaminado por necrochorume	<i>Folsomia candida</i>	
	Número médio de organismos	Coefficiente de variação (%)
SAT	1161,75	27,30
CA	1143,88	26,30
7 meses	482	28,67
10 meses	457	17,95

CA. Controle ambiental; **SAT.** Solo artificial tropical; **7 meses.** Amostra do ponto 4 coletada aos 7 meses; **10 meses.** Amostra do ponto 4 coletada aos 10 meses. **Fonte:** Elaborado pela autora (2024).

Na Figura 12, estão expressos o número total de organismos, em cada tempo avaliado, após a exposição dos mesmos ao solo contaminado por necrochorume, por 28 dias. Neste teste, ambos os solos coletados (7 e 10 meses após a segunda inumação do porco) apresentaram toxicidade, em relação ao CA e ao SAT.

Figura 12. Resultado do teste da toxicidade do necrochorume na reprodução de *F. candida*.



CA. Controle ambiental; **SAT.** Solo artificial tropical; **7 meses.** Amostra do ponto 4 coletada aos 7 meses; **10 meses.** Amostra do ponto 4 coletada aos 10 meses. * Estatisticamente significativo em comparação ao SAT ($p < 0,05$), por meio do teste Anova/Dunnett. **Fonte:** Elaborado pela autora (2024).

De acordo com os dados apresentados, não foram observados níveis de letalidade crônica nas amostras testadas. Em contrapartida, os organismos continuaram a se reproduzir, mas com uma redução significativa no número de juvenis, destacando a maior sensibilidade de *F. candida* ao contaminante. Nota-se a semelhança no número de juvenis entre as amostras coletadas (7 meses e aos 10 meses), o que pode indicar uma persistência no solo dos contaminantes tóxicos do necrochorume, ao longo do tempo.

Rai et al. (2022), ao estudarem efeitos do processo de decomposição de carcaças suínas em covas rasas com abundância de ácaros no solo, constataram uma elevação significativa no pH do solo, alterando-o de neutro para alcalino. Essa modificação no pH, juntamente com as mudanças nas propriedades físico-químicas do solo, induziram um aumento significativo da densidade populacional de microartrópodes, como os colêmbolos. Os resultados do presente estudo já indicaram que a decomposição da carcaça suína promoveu uma redução do pH dos solos, pós inumação (7 e 10 meses), com um conseqüente declínio populacional dos colêmbolos a eles expostos. Os dados aqui apresentados corroboram os de Rai et al. (2022), quanto a influência do pH na toxicidade do solo e que pH ácidos apresentam maior toxicidade que os alcalinos, para a microbiota do solo, especialmente para colêmbolos.

Esses ensaios de avaliação de efeitos subletais para colêmbolos, são particularmente importantes, porque permitem uma previsão de impactos de contaminantes sobre os ecossistemas edáficos (De Menezes Oliveira et al., 2017). Com estes ensaios, é possível avaliar a redução de diversas funções biológicas, como a inibição do crescimento e a diminuição da taxa de reprodução, fatores que influenciam, diretamente, a dinâmica populacional dos organismos edáficos, ao longo do tempo (Oliveira, 2019).

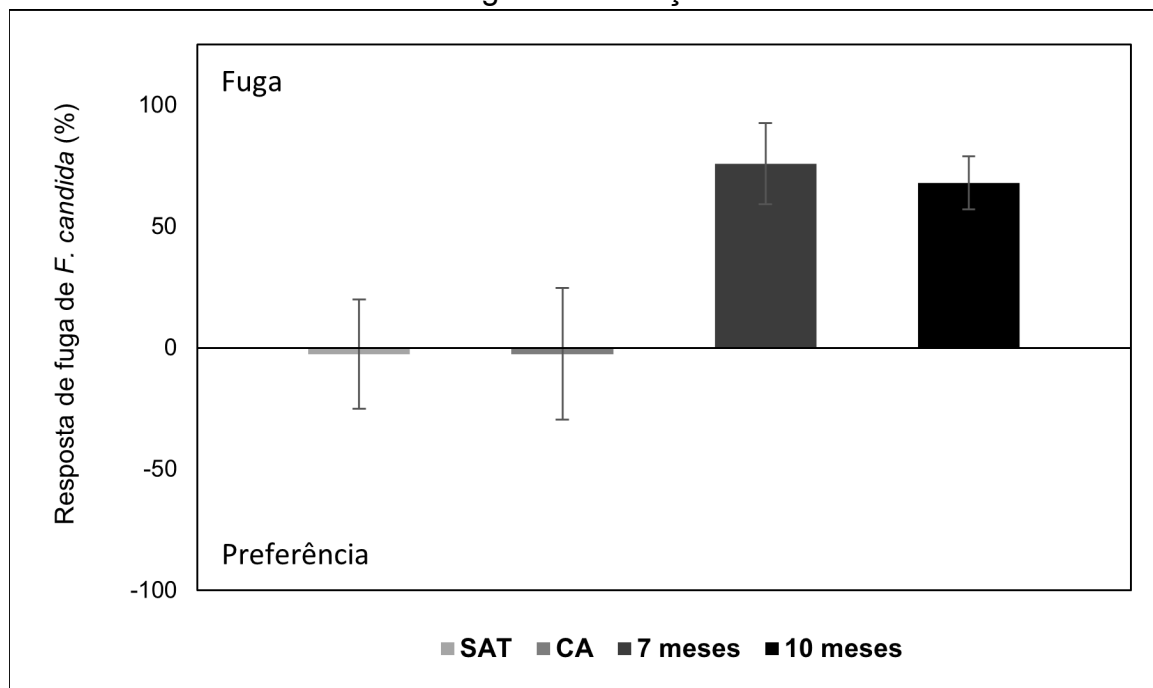
5.3.2 Teste de fuga

Os resultados do teste de fuga com *F. candida* exposto aos solos contaminados por necrochorume, por 48h, estão expressos na Figura 13.

Os resultados dos testes mostraram uma distribuição homogênea dos indivíduos nos controles (faixa de 40 a 60%, para cada lado), e mortalidade dos

colêmbolos inferior a 20%, o que validou o teste, de acordo com critérios da Norma ISO 17512-2 (2011).

Figura 13. Porcentagem de fuga (média \pm desvio padrão) de colêmbolos (*Folsomia candida*) expostos a solos contaminados com necrochorume após 7 e 10 meses da segunda inumação.



CA. Controle ambiental; **SAT.** Solo artificial tropical; **7 meses.** Amostra do ponto 4 coletada aos 7 meses; **10 meses.** Amostra do ponto 4 coletada aos 10 meses. **Fonte:** Elaborado pela autora (2024).

Os resultados do teste de fuga do presente estudo mostraram que os colêmbolos expostos, por 48 horas, às duas amostras de solos contaminados com necrochorume (7 e 10 meses, pós inumação), exibiram valores percentuais de fuga positivos semelhantes entre si. Estas respostas sugerem que os compostos liberados na decomposição cadavérica podem induzir um comportamento de fuga e rejeição do solo contaminado, para *F. candida*, portanto, tóxicos para este organismo. Como foi observado pelo teste, mesmo após 10 meses da atenuação natural, o solo se manteve tóxico para colêmbolos. Por esses resultados, sugere-se que sejam realizados mais estudos com esses solos atenuados por mais tempo, para poder estimar melhor a persistência desses contaminantes neste compartimento ambiental.

Conforme descrito por Rai et al. (2022), a liberação de necrochorume promove modificações significativas na química do solo, com destaque para a

alteração do pH. Szelecz et al. (2018) afirmam ainda que, de maneira geral, a decomposição de mamíferos, inicialmente, eleva o pH do solo, tornando-o mais alcalino, mas este se torna mais ácido, à medida que se aproxima dos estágios finais da decomposição. De acordo com o mesmo autor, a variação do pH é atribuída à acumulação de íons de amônio (NH_4^+), resultantes da amonificação de proteínas durante a autólise e a putrefação, processos estes que ocorrem durante as fases de inchaço corporal e decomposição ativa.

Szelecz et al. (2016), e Rai et al. (2022) citam que o pH alcalino, gerado pela decomposição cadavérica, aumenta a abundância e a diversidade de invertebrados do solo. Os resultados do teste de fuga, do presente estudo, indicam que a característica ácida das amostras dos solos estudados foi um fator determinante para a fuga observada no teste com os colêmbolos.

Como enfatizado por Netto et al. (2021) e Saba et al. (2023), a aplicação de testes ecotoxicológicos em organismos não alvo é uma estratégia eficaz para estimar as concentrações aceitáveis de substâncias tóxicas no ambiente. Nesse contexto, os experimentos realizados com os bioindicadores *F. candida* e *E. crypticus*, no presente estudo, foram essenciais para avaliar a toxicidade do necrochorume, especialmente para estimar os impactos dos ambientes cemiteriais. Tais estudos fornecem dados relevantes, que contribuem, significativamente, para o entendimento dos riscos e limites de tolerância ambiental, associados a esse tipo de contaminação.

Considerando a produção contínua e elevada de necrochorume nos cemitérios, especialmente registrada recentemente (pandemia de SARS-CoV-2), como destacado por Gonçalves et al. (2022), e a carência de políticas adequadas para o manejo e tratamento desses resíduos cemiteriais (Neckel et al., 2017), é necessária a realização de pesquisas mais centradas nos impactos ambientais e sobre a saúde humana, para se estimar os reais efeitos danosos deste contaminante urbano.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, foram conduzidos testes de toxicidade em solo contaminado por necrochorume, utilizando dois invertebrados presentes em sistemas edáficos (*E. crypticus* e *F. candida*). Os testes incluíram ensaios de comportamento de fuga e reprodução. Os resultados obtidos nos testes de comportamento de fuga e toxicidade crônica do necrochorume são inéditos. Os resultados dos ensaios dos solos contaminados foram comparados tanto com solo artificial tropical (SAT), indicados pela OECD (2004) e ISO 17512-2 (2011), como com solos controle ambiental (CA).

De acordo com os resultados obtidos:

Os invertebrados bioindicadores *F. candida* e *E. crypticus* apresentam alta sensibilidade para os compostos derivados da decomposição cadavérica. Todos os testes apresentaram resultados estatisticamente significativos. Dessa forma, nas amostras de solo contaminadas com necrochorume, de ambos os tempos estudados (7 e 10 meses, após a inumação), houve diminuição na reprodução dos bioindicadores utilizados, indicando toxicidade crônica para o composto. Essa diminuição na taxa de reprodução dos organismos expostos ao solo contaminado por necrochorume foi maior nos testes com *F. candida* em comparação com *E. crypticus*, indicando a maior sensibilidade dos colêmbolos ao contaminante.

Dada a alta sensibilidade de *F. candida* ao necrochorume, ressalta-se a importância da utilização desse organismo como indicador biológico de toxicidade para o contaminante em questão. Em contrapartida, os enquitreídeos se reproduziram menos no solo natural, indicando não só a sensibilidade ao contaminante, como também a sensibilidade desses organismos ao pH ácido do solo.

Os ensaios de curta duração, como os testes de fuga realizados com *E. crypticus* e *F. candida*, se caracterizam como uma alternativa rápida de avaliação dos efeitos danosos de contaminantes de solo, sobre a biota endêmica. Esses ensaios também se mostraram indicados para serem usados como indicadores de condições adversas de sistemas edáficos. Com base nos resultados dos testes de fuga, realizados com colêmbolos e enquitreídeos, é possível concluir que a presença de necrochorume afeta negativamente o comportamento dessas espécies.

Portanto, a simulação da inumação da carcaça suína, nos moldes desenvolvidos neste estudo, demonstrou ser eficaz para avaliação os efeitos tóxicos do necrochorume sobre a biota edáfica, bem como para certificar as alterações na qualidade do solo, com por exemplo, do pH. O estudo também esclarece a intensificação dos efeitos tóxicos, devido à reutilização de covas em ambientes de cemitérios.

A originalidade deste estudo reside na análise da toxicidade do necrochorume em solos naturais, utilizando invertebrados como bioindicadores. Isso porque, embora os seus efeitos tóxicos sejam teoricamente reconhecidos, ainda há uma lacuna no conhecimento sobre os impactos ambientais dos compostos derivados dos processos de decomposição cadavérica, comuns em ambientes cemiteriais.

Embora exista um número considerável de pesquisas utilizando invertebrados bioindicadores, observa-se uma escassez de literatura científica, sobretudo para solos tropicais, sobre a toxicidade dos compostos derivados da decomposição cadavérica, para organismos modelo da fauna edáfica. Isso destaca a relevância deste estudo e a necessidade urgente de se ampliar as pesquisas com diferentes grupos de organismos edáficos para avaliar os efeitos tóxicos do necrochorume, com o objetivo de promover práticas de manejo mais sustentáveis nos cemitérios e garantir a saúde das comunidades vizinhas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFANGIDEH, Christopher Brownson; UDOKPOH, U. U. Environmental impact assessment of groundwater pollution within cemetery surroundings. **Indian Journal of Engineering**, v. 19, n. 51, p. 100-115, 2022.
- AL-MEKHLAFI, Fahd A. Decomposition process for buried rat (*Rattus norvegicus*, Berkenhout 1769) carcasses in Riyadh city, Saudi Arabia: A preliminary study. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 7, p. 3745-3750, 2021.
- AL-QAHTNI, Abdullah et al. Seasonal impact of heroin on rabbit carcass decomposition and insect succession. **Journal of Medical Entomology**, v. 58, n. 2, p. 567-575, 2021.
- ALVES, Paulo Roger Lopes et al. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. **Science of the Total Environment**, v. 526, p. 222-232, 2015.
- ALVES, Paulo Roger Lopes et al. Ecotoxicological impact of arsenic on earthworms and collembolans as affected by attributes of a highly weathered tropical soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 13217-13225, 2018.
- AMENDT, Jens et al. Helicopter thermal imaging for detecting insect infested cadavers. **Science & Justice**, v. 57, n. 5, p. 366-372, 2017.
- AMORIM, Mónica JB et al. Annelid genomes: *Enchytraeus crypticus*, a soil model for the innate (and primed) immune system. **Lab Animal**, v. 50, n. 10, p. 285-294, 2021.
- ANTONIO, A. S. et al. Avaliação de características químicas do solo durante a decomposição cadavérica e suas aplicações à química forense. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 3, p. 574-599, 2018.
- ARMSTRONG, P. et al. Establishing the volatile profile of pig carcasses as analogues for human decomposition during the early postmortem period. **Heliyon**, v. 2, n. 2, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 11267**: Qualidade do solo – Inibição da reprodução de *Collembola (Folsomia candida)* por poluentes do solo. Rio de Janeiro, 2019.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 15537**: Ecotoxicologia terrestre: ecotoxicidade aguda: método de ensaio com minhocas. Rio de Janeiro, 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 16387**: Qualidade do solo — Efeitos de poluentes em *Enchytraeidae (Enchytraeus sp.)* — Determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência. Rio de Janeiro, 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 17512-1**: Qualidade do solo – Ensaio de fuga para avaliar a qualidade dos solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento: Parte 1: Ensaio com minhocas (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*). Rio de Janeiro, 2011.
- BACHMANN, Jutta; SIMMONS, Tal. The influence of preburial insect access on the decomposition rate. **Journal of Forensic Sciences**, v. 55, n. 4, p. 893-900, 2010.
- BARETTA, Dilmar et al. Collembola community structure as a tool to assess land use effects on soil quality. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, p. e0150432, 2016.
- BARTON, Philip S. et al. Soil chemical markers distinguishing human and pig decomposition islands: a preliminary study. **Forensic Science, Medicine and Pathology**, v. 16, p. 605-612, 2020.

BRASIL, Lei nº 6.938. Institui a Política Nacional do Meio Ambiente, 1981.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 335, de 3 de abril de 2003. Dispõe sobre o licenciamento ambiental de cemitérios.

BREDA, Carlos Cesar et al. Successive sewage sludge fertilization: Recycling for sustainable agriculture. **Waste Management**, v. 109, p. 38-50, 2020.

BROWN, George Gardner et al. Biodiversidade da fauna do solo e sua contribuição para os serviços ambientais. In: PARRON, Lucilia Maria et al. (ed.). **Serviços ambientais em sistemas agrícolas e florestais do Bioma Mata Atlântica**. Brasília: Embrapa, 2015. p. 121-154.

BUCH, Andressa Cristhy et al. Ecotoxicity of mercury to *Folsomia candida* and *Proisotoma minuta* (Collembola: Isotomidae) in tropical soils: baseline for ecological risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 22-29, 2016.

CASTRO, Manuel; CENTENO, Néstor; GONZÁLEZ-VAINER, Patricia. An initial study of insect succession on pig carcasses in open pastures in the northwest of Uruguay. **Forensic Science International**, v. 302, p. 109837, 2019.

CONNOR, Melissa; BAIGENT, Christiane; HANSEN, Eriek S. Testing the use of pigs as human proxies in decomposition studies. **Journal of Forensic Sciences**, v. 63, n. 5, p. 1350-1355, 2018.

CRISANTO-PERRAZO, Tania et al. Determination of Empirical Environmental Indices for the Location of Cemeteries—An Innovative Proposal for Worldwide Use. **Sustainability**, v. 14, n. 10, p. 6284, 2022.

DA LUZ, Tiago Natal; RIBEIRO, Rui; SOUSA, José Paulo. Avoidance tests with collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 23, n. 9, p. 2188-2193, 2004.

DA SILVA, Joaklebio Alves; DE PAULA MARQUES, Maria Juliana Dantas. Impactos ambientais causados por necrochorume de cemitérios: um olhar para os possíveis riscos à saúde pública. **Revista Mundi Meio Ambiente e Agrárias** (ISSN: 2525-4790), v. 2, n. 1, 2017.

DAWSON, Blake M.; WALLMAN, James F.; BARTON, Philip S. How does mass loss compare with total body score when assessing decomposition of human and pig cadavers? **Forensic Science, Medicine and Pathology**, v. 18, n. 3, p. 343-351, 2022.

DE MENEZES OLIVEIRA, Vanessa Bezerra; DE OLIVEIRA BIANCHI, Miriam; ESPÍNDOLA, Evaldo Luiz Gaeta. 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.

DEBRUYN, Jennifer M. et al. Comparative decomposition of humans and pigs: soil biogeochemistry, microbial activity and metabolomic profiles. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 608856, 2021.

ELEMENT, C. A. S. Method 3015A microwave assisted acid digestion of aqueous samples and extracts. **Environmental Protection Agency, Washington, DC**, 2007.

FANG, Shiyong et al. A pilot study investigating early postmortem interval of rats based on ambient temperature and postmortem interval-related metabolites in blood. **Forensic Science, Medicine and Pathology**, p. 1-9, 2023.

FERREIRA, Letícia de Jesus. **Avaliação ecotoxicológica de hidrocarbonetos com organismos da fauna edáfica**. 2021. 1 recurso online (98 p.) Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Tecnologia, Limeira, SP.

FERREIRA, Tatiane Cristovam et al. Análise dos impactos e potencial de danos da composição e percolação do necrochorume no solo. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 25094-25112, 2021.

GEISSENBERGER, J. et al. Morphological changes and protein degradation during the decomposition process of pig cadavers placed outdoors or in tents—a pilot study. **Forensic Science, Medicine and Pathology**, p. 1-10, 2023.

GONÇALVES, Letícia Rocha et al. Another casualty of the SARS-CoV-2 pandemic—the environmental impact. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-16, 2022.

GONÇALVES, Vanessa et al. Delineation of Potential Groundwater Zones and Assessment of Their Vulnerability to Pollution from Cemeteries Using GIS and AHP Approaches Based on the DRASTIC Index and Specific DRASTIC. **Water**, v. 16, n. 4, p. 585, 2024.

HAU, Teo Chee et al. Decomposition process and post mortem changes. **Sains Malaysiana**, v. 43, n. 12, p. 1873-1882, 2014.

IDEHEN, O.; EZENWA, I. M. Influence of third cemetery location on the quality of domestic and groundwater resources in Benin City, Nigeria. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 23, n. 1, p. 5–11-5–11, 2019.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11267: Soil quality - Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. Geneve: ISO, 1999.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11268-2: Soil quality — Effects of pollutants on earthworms — Part 2: Determination of effects on reproduction to *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*. Geneve, 2011.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 16387: Soil quality — Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): Determination of effects on reproduction and survival. Geneve, 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 17512-2: Soil quality — Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior — Part 2: Test with collembolans (*Folsomia candida*). Geneve, 2011.

IOAN, Beatrice Gabriela et al. The chemistry decomposition in human corpses. **Rev Chim**, v. 68, n. 6, p. 1352-1356, 2017.

JIN, Youshun et al. Decomposition and C, N and P release of Tibetan sheep dung from an alpine meadow with different stocking rates. **Ecological Indicators**, v. 144, p. 109561, 2022.

JÓZEFOWSKA, Agnieszka et al. Colonisation by enchytraeids as a suitable indicator of successful biological reclamation of post-mining technosols using alders. **Applied soil ecology**, v. 145, p. 103300, 2020.

KANDOLI, Salman Jafarpoor et al. Assessment of cemetery effect on groundwater quality using GIS. **Desalination and Water Treatment**, v. 168, p. 235-242, 2019.

KI, Bo-Min et al. Characterization of odor emissions and microbial community structure during degradation of pig carcasses using the soil burial-composting method. **Waste Management**, v. 77, p. 30-42, 2018.

LEE, Michael J. et al. Preliminary investigation of aircraft mounted thermal imaging to locate decomposing remains via the heat produced by larval aggregations. **Forensic Science International**, v. 289, p. 175-185, 2018.

- LI, Simin et al. Cadmium toxicity to and accumulation in a soil collembolan (*Folsomia candida*): major factors and prediction using a back-propagation neural network model. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-12, 2024.
- LI, Yanpei; WANG, Jiao; SHAO, Ming'an. Assessment of earthworms as an indicator of soil degradation: A case-study on loess soils. **Land Degradation & Development**, v. 32, n. 8, p. 2606-2617, 2021.
- LIN, Xianglong et al. The toxicity of exogenous arsenic to soil-dwelling springtail *Folsomia candida* in relation to soil properties and aging time. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 171, p. 530-538, 2019.
- LIU, Manqiang et al. After-life legacy effects of enchytraeids increase the functional capability of arable soil following stress. **Biology and Fertility of Soils**, v. 58, n. 6, p. 721-732, 2022.
- LONG, Fayu et al. Multi-Trophic Species Diversity Contributes to the Restoration of Soil Multifunctionality in Degraded Karst Forests through Cascading Effects. **Forests**, v. 15, n. 3, p. 559, 2024.
- LOPES, Bruna Caroline Honório et al. Multixenobiotic response of Collembola to soil contamination, the physiological basis for bioindicative environmental monitoring. **Chemosphere**, v. 349, p. 140851, 2024.
- LUO, Wei; VERWEIJ, Rudo A.; VAN GESTEL, Cornelis AM. Contribution of soil properties of shooting fields to lead bioavailability and toxicity to *Enchytraeus crypticus*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 76, p. 235-241, 2014.
- MACHADO, Julia da Silva et al. Morphological diversity of springtails (Hexapoda: Collembola) as soil quality bioindicators in land use systems. **Biota Neotropica**, v. 19, p. e20180618, 2019.
- MACHADO, Julia da Silva. Diversidade morfológica de colêmbolos (Hexapoda: Collembola) em sistemas de manejo do solo. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Centro de ciências agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Lages, 2015.
- MALHEIRO, Catarina et al. Effects of climate conditions on the avoidance behavior of *Folsomia candida* and *Enchytraeus crypticus* towards metal (loid)-contaminated soils. **Science of The Total Environment**, v. 741, p. 140368, 2020.
- MARTINS, Gabriel Caixeta et al. Assessment of the reproduction of six collembolan species in tropical soils naturally rich in potentially toxic elements. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-13, 2024.
- MARTINS, Marcela Ravanelli. **Aplicação de lodo de esgoto no solo: avaliação da estabilização e da toxicidade = Sewage sludge application on soil: evaluation of stabilization and toxicity**. 2020. 1 recurso online (108 p.) Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Tecnologia, Limeira, SP.
- MATUSZEWSKI, Szymon et al. Pigs vs people: the use of pigs as analogues for humans in forensic entomology and taphonomy research. **International Journal of Legal Medicine**, v. 134, p. 793-810, 2020.
- MCINTOSH, Craig S.; DADOUR, Ian R.; VOSS, Sasha C. A comparison of carcass decomposition and associated insect succession onto burnt and unburnt pig carcasses. **International Journal of Legal Medicine**, v. 131, p. 835-845, 2017.
- MELIS, Claudia et al. Soil and vegetation nutrient response to bison carcasses in Białowieża Primeval Forest, Poland. **Ecological Research**, v. 22, n. 5, p. 807-813, 2007.

- MENDES, Luís A. et al. Co-Exposure of Nanopolystyrene and Other Environmental Contaminants—Their Toxic Effects on the Survival and Reproduction of *Enchytraeus crypticus*. **Toxics**, v. 10, n. 4, p. 193, 2022.
- MENTA, Cristina; REMELLI, Sara. Soil health and arthropods: From complex system to worthwhile investigation. **Insects**, v. 11, n. 1, p. 54, 2020.
- MILANO, V. et al. The effect of urban park landscapes on soil Collembola diversity: A Mediterranean case study. **Landscape and urban planning**, v. 180, p. 135-147, 2018.
- NASCIMENTO, Francisleile Lima. Cemitério x novo coronavírus: impactos da COVID-19 na saúde pública e coletiva dos mortos e dos vivos. **Boletim de Conjuntura (BOCA)**, v. 2, n. 4, p. 01-09, 2020.
- NASCIMENTO, Francisleile Lima; SENHORAS, Elói Martins. Análise ambiental comparada dos cemitérios urbanos e aterros sanitários. **Boletim de Conjuntura (BOCA)**, v. 9, n. 25, p. 70-79, 2022.
- NECKEL, Alcindo et al. Environmental damage and public health threat caused by cemeteries: a proposal of ideal cemeteries for the growing urban sprawl. Urbe. **Revista Brasileira De Gestão Urbana**, v. 9, p. 216-230, 2017.
- NECKEL, Alcindo et al. Metals in the soil of urban cemeteries in Carazinho (South Brazil) in view of the increase in deaths from COVID-19: projects for cemeteries to mitigate environmental impacts. **Environment, Development and Sustainability**, p. 1-24, 2021.
- NETTO, Leonides Guireli et al. Delineation of necroleachate pathways using electrical resistivity tomography (ERT): Case study on a cemetery in Brazil. **Environmental Challenges**, v. 5, p. 100344, 2021.
- NIEMEYER, Júlia Carina; CHELINHO, Sónia; SOUSA, José Paulo. Soil ecotoxicology in Latin America: Current research and perspectives. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 36, n. 7, p. 1795-1810, 2017.
- NIVA, C.C.; BROWN, G.G. (Ed.). Ecotoxicologia terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas. Brasília: Embrapa, 2019. 258p.
- OLIVEIRA FILHO, Luís Carlos Iuñes; BARETTA, Dilmar. Por que devemos nos importar com os colêmbolos edáficos? **Scientia agraria**, v. 17, n. 2, p. 21-40, 2016.
- OLIVEIRA, M. et al. Effects of short-term exposure to fluoxetine and carbamazepine to the collembolan *Folsomia candida*. **Chemosphere**, v. 120, p. 86-91, 2015.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT - OECD 207. Earthworm, Acute Toxicity Tests - Guideline for Testing of Chemicals. Paris. 1984.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. Test No. 220: Enchytraeid Reproduction Test. OECD Publishing, Paris, 2004.
- ORTIZ, Danielle Cristina et al. Diversity of springtails (Collembola) in agricultural and forest systems in Southern Santa Catarina. **Biota Neotropica**, v. 19, p. e20180720, 2019.
- PAKOSH, Caitlin M.; ROGERS, Tracy L. Soft tissue decomposition of submerged, dismembered pig limbs enclosed in plastic bags. **Journal of Forensic Sciences**, v. 54, n. 6, p. 1223-1228, 2009.
- PAYNE, Jerry A. A summer carrion study of the baby pig *Sus scrofa Linnaeus*. **Ecology**, v. 46, n. 5, p. 592-602, 1965.

- PECHAL, Jennifer L. et al. The potential use of bacterial community succession in forensics as described by high throughput metagenomic sequencing. *International journal of legal medicine*, v. 128, p. 193-205, 2014.
- PEGG, Anthony E. Toxicity of polyamines and their metabolic products. **Chemical research in toxicology**, v. 26, n. 12, p. 1782-1800, 2013.
- PELOSI, Celine; RÖMBKE, Jörg. Are Enchytraeidae (Oligochaeta, Annelida) good indicators of agricultural management practices? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 100, p. 255-263, 2016.
- PELOSI, Celine; RÖMBKE, Jörg. Enchytraeids as bioindicators of land use and management. **Applied soil ecology**, v. 123, p. 775-779, 2018.
- PEREIRA, Franco Dani Campos. Estudo dos efeitos biológicos da poliamina putrescina em diferentes organismos-teste. Rio Claro, 2017, 163 p. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Instituto de Biociências, Rio Claro-SP, 2017.
- QUINTON, Jessica M.; ÖSTBERG, Johan; DUINKER, Peter N. The influence of cemetery governance on tree management in urban cemeteries: A case study of Halifax, Canada and Malmö, Sweden. **Landscape and Urban Planning**, v. 194, p. 103699, 2020.
- RAI, Jas K.; PICKLES, Brian J.; PEROTTI, M. Alejandra. The impact of the decomposition process of shallow graves on soil mite abundance. **Journal of Forensic Sciences**, v. 67, n. 2, p. 605-618, 2022.
- RANGEL, Andrés Miranda. Impact of environmental factors on edaphic springtail populations: Impacto de fatores ambientais nas populações de rabo de mola edáfico. **Studies in Environmental and Animal Sciences**, v. 3, n. 4, p. 992-1002, 2022.
- REGITANO, Jussara Borges; ALLEONI, Luís Reynaldo Ferracciú; TORNISIELO, Valdemar Luiz. Atributos de solos tropicais e a sorção de imazaquin. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 801-807, 2001.
- RIEFF, Gleidson Gimenes et al. Diversity of springtails and mites of a native forest in southern Brazil: relationship with the indices of temperature and precipitation in the native environment. **International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering**, v. 4, p. 684-92, 2014.
- RUGGIERO, Michael A. et al. A higher level classification of all living organisms. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0119248, 2015.
- SABA, Elias D. et al. Evaluating the impact of a cemetery on groundwater by multivariate analysis. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 195, n. 2, p. 270, 2023.
- SALMON, Sandrine et al. Responses of Collembola communities to mixtures of wheat varieties: A trait-based approach. **Pedobiologia**, v. 87, p. 150755, 2021.
- SANTOS, Marcielli Aparecida Borges dos et al. Morphological diversity of springtails in land use systems. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 42, p. e0170277, 2018.
- SCHLAGHAMERSKÝ, Jiří; KRAWCZYNSKI, René. Does carcass decomposition affect soil-dwelling enchytraeids? **Soil Organisms**, v. 87, n. 2, p. 91–100-91–100, 2015.
- SCHWEGMANN, Sebastian et al. Evisceration residues from hunted roe deer as a resource for necrophagous insect fauna in the Black Forest, Germany: a preliminary study. **Wildlife Biology**, v. 2022, n. 6, p. e01055, 2022.
- SEGAT, Julia C. et al. Ecotoxicological effects of swine manure on *Folsomia candida* in subtropical soils. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, p. e20180758, 2020.

- SOUZA, Raphael Bastão de. Avaliação do potencial tóxico de dois metalo-inseticidas em organismos não alvos. Rio Claro, 2016, 141 p. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Instituto de Biociências, Rio Claro-SP, 2016.
- STERZYŃSKA, Maria et al. Urban springtail species richness decreases with increasing air pollution. **Ecological Indicators**, v. 94, p. 328-335, 2018.
- STOKES, Kathryn L.; FORBES, Shari L.; TIBBETT, Mark. Human versus animal: contrasting decomposition dynamics of mammalian analogues in experimental taphonomy. **Journal of forensic sciences**, v. 58, n. 3, p. 583-591, 2013.
- SZELECZ, Ildikó et al. Effects of decomposing cadavers on soil nematode communities over a one-year period. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 405-416, 2016.
- SZELECZ, Ildikó et al. Soil chemistry changes beneath decomposing cadavers over a one-year period. **Forensic Science International**, v. 286, p. 155-165, 2018.
- TEAM, R. Core. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2023.
- TEIXEIRA, Paulo César et al. Manual de métodos de análise de solo. 2017. 3. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa. 573 p.
- TELES, Anna Gabriela Drummond Xavier et al. Characterization and Ecotoxicity of Raw and Treated Liquid Effluent from the Washing of Soybean Seed Treatment Machines. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 235, n. 1, p. 66, 2024.
- TEMBE, Danisile; MALATJI, Mokgadi Pulane; MUKARATIRWA, Samson. Molecular identification and diversity of adult arthropod carrion community collected from pig and sheep carcasses within the same locality during different stages of decomposition in the KwaZulu-Natal province of South Africa. **PeerJ**, v. 9, p. e12500, 2021.
- TOSCAN, Paloma Carollo et al. Use of geospatial tools to predict the risk of contamination by SARS-CoV-2 in urban cemeteries. **Geoscience Frontiers**, v. 13, n. 6, p. 101310, 2022.
- TWARDOWSKI, Jacek Piotr; HUREJ, Michał; GRUSS, Iwona. Diversity and abundance of springtails (Hexapoda: Collembola) in soil under 90-year potato monoculture in relation to crop rotation. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 62, n. 8, p. 1158-1168, 2016.
- VAŠÍČKOVÁ, Jana et al. Ecotoxicity of arsenic contaminated sludge after mixing with soils and addition into composting and vermicomposting processes. **Journal of hazardous materials**, v. 317, p. 585-592, 2016.
- VIEGAS, Carla et al. Six Feet under Microbiota: Microbiologic Contamination and Toxicity Profile in Three Urban Cemeteries from Lisbon, Portugal. **Toxins**, v. 14, n. 5, p. 348, 2022.
- VINCENT, Quentin et al. Assessment of derelict soil quality: Abiotic, biotic and functional approaches. **Science of the Total Environment**, v. 613, p. 990-1002, 2018.
- WANG, Min et al. Distinct structural strategies with similar functional responses of abundant and rare subcommunities regarding heavy metal pollution in the Beiyun river basin. **Chemosphere**, v. 309, p. 136659, 2022.
- WANG, XiaoQing et al. Soil ecological criteria for nickel as a function of soil properties. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 2137-2146, 2018.
- WANG, Yilin et al. Animal models of epilepsy: a phenotype-oriented review. **Aging and Disease**, v. 13, n. 1, p. 215, 2022.

WANG, Yu et al. Insect succession on remains of human and animals in Shenzhen, China. **Forensic science international**, v. 271, p. 75-86, 2017.

YANG, Guo-hang et al. Accumulation and bioavailability of heavy metals in a soil-wheat/maize system with long-term sewage sludge amendments. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 8, p. 1861-1870, 2018.

YU, Zhuyun et al. Dinotefuran alters Collembola-fungi-bacteria interactions that control mineralization of maize and soil organic carbon. **Journal of Hazardous Materials**, v. 418, p. 126391, 2021.