

## Preparo do substrato teste

Julia Carina Niemeyer  
Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso  
Maria Edna Tenório Nunes  
Paulo Roger Lopes Alves  
Alexandre Martin Martines  
Mara Mercedes de Andréa  
George Gardner Brown  
Cintia Carla Niva

A maior parte dos ensaios padronizados para invertebrados do solo foi desenvolvida para fornecer uma estimativa numérica dos efeitos da exposição a substâncias ou elementos químicos sobre os organismos, em substratos ou solos artificiais formulados. O primeiro substrato artificial recomendado para ensaios de toxicidade com minhocas (*Eisenia fetida*) foi o Artisol (Association Française de Normalisation, 1984), composto por sílica gel em mistura com bolas de vidro e água, sem qualquer similaridade com as propriedades físicas e químicas dos solos naturais. No Brasil, até recentemente, o Artisol era recomendado como substrato em normas locais (Ibama, 1990; Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1990).

A partir de 1994, a Portaria nº 139 de 21 de dezembro de 1994 do Ibama introduziu a possibilidade de realização de ensaios ecotoxicológicos com metodologias distintas das constantes do manual do Ibama, desde que referenciadas e reconhecidas internacionalmente (Ibama, 1994). Passaram a ser utilizados os ensaios feitos de acordo com normas internacionais, como da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) ou da Agência Norte-Americana de Proteção do Meio Ambiente (EPA), mas somente substratos artificiais eram utilizados. Somente em 2007 a norma ABNT foi adotada no país, para ensaios de ecotoxicidade aguda com minhocas (ABNT, 2007), propondo o uso de solo artificial composto por areia, caulim e uma fonte de matéria orgânica.

Obviamente, o uso de solos de origem natural em ensaios ecotoxicológicos é importante em determinadas situações devido à maior relevância ecológica em comparação ao uso de solo artificial. Apesar disso, o uso do solo artificial ainda é bastante comum por ser um substrato padronizado e que permite comparações. Tanto para o uso do solo natural como para o solo artificial, ainda existem questões discutíveis em termos de relevância ou adequabilidade para as condições tropicais, ou do Brasil (ver capítulos 2 e 3; Cesar et al., 2014) que precisam ser discutidas amplamente e definidas. A seguir, descrevemos o preparo do solo artificial e natural como substratos para os ensaios ecotoxicológicos com organismos de solo.

## 7.1 Solo artificial

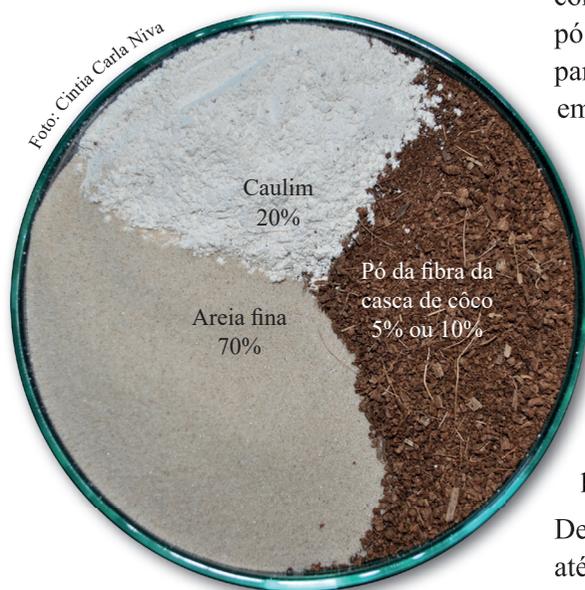
O substrato padrão, recomendado pelas normas ISO/OECD para a maioria dos estudos ecotoxicológicos terrestres com oligoquetas, é o solo artificial OECD (OECD, 1984), constituído por uma mistura de 70% de areia industrial fina (quartzosa -  $\text{SiO}_2$ ), 20% de argila caulínica (pelo menos 30% de caulinita) e 10% de turfa (moída e seca). No entanto, alguns autores tem adaptado a composição deste substrato para as condições ambientais brasileiras (Römbke et al., 2007; Garcia et al., 2011), sendo então denominado como Solo Artificial Tropical (SAT) (Figura 7.1). Neste caso, a fonte de matéria orgânica utilizada é o pó de fibra de casca de coco (seca e peneirada) em substituição à turfa devido à sua maior disponibilidade. Esta adaptação foi proposta por Garcia et al. (2004) e se manteve com a seguinte composição: 70% do volume total da mistura de areia, 20% de caulim e 10% de pó de fibra de casca de coco e tem sido a mais utilizada atualmente. Internacionalmente, o uso da fibra da casca de coco na composição do solo artificial também foi recomendada para regiões de clima tropical por De Silva et al. (2009). Recomenda-se que estudos adicionais sejam realizados para que estas proporções sejam mais bem ajustadas aos solos tropicais, especialmente no que diz respeito à porcentagem de matéria orgânica, já que constitui-se em um parâmetro do solo importante na avaliação de risco ambiental de agrotóxicos (Gomes; Espadotto, 2004). Na versão atualizada da norma ISO 16387 (ISO, 2014) aceita-se também a utilização de 5% de turfa nos ensaios com enquitreídeos, demonstrando a tendência de mudança nas recomendações para o solo artificial.

Tanto para o substrato de criação das minhocas quanto para a produção do SAT, o pó da fibra da casca de coco é largamente utilizado no Brasil (Tomczak et al., 2007; Dias et al., 2009). Este produto, obtido comercialmente, não deve conter adição de fertilizantes. Antes de ser utilizado na preparação do SAT, o pó de fibra de coco deve ser peneirado (malha 5 mm) e disposto em bandejas para secar ao ar livre, já que há certa umidade agregada ao seu conteúdo, ou em estufa a 60 °C por 24 horas.

O caulim (Figura 7.1), representando a fração de argila no solo, também é obtido comercialmente e deve ser esterilizado para ser utilizado no SAT. O caulim (de grau analítico) tem sido o mais utilizado atualmente.

Em relação à areia, mais de 50% das partículas devem ter entre 0,05 mm e 0,2 mm de diâmetro. Para garantir maior pureza, a areia deve ser lavada várias vezes com água deionizada e seca em estufa a 105 °C por 24 horas. A análise química da areia, e também do caulim, especialmente em relação aos possíveis resíduos de carbonato de cálcio presentes, pode prevenir problemas de ajuste do pH do substrato depois de preparado.

Depois da preparação inicial, os componentes do SAT devem ser misturados até a homogeneização. Retira-se, então, uma amostra para determinação do pH (ver seção 7.5), que deve estar na faixa de  $6,0 \pm 0,5$ . A correção do pH (no caso de estar abaixo da faixa recomendada) pode ser feita pela adição de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Em geral, o pH do SAT atinge a faixa recomendada sem



**Figura 7.1.** Composição do Solo Artificial Tropical.

correção com  $\text{CaCO}_3$ , mas a qualidade dos componentes pode variar bastante em termos de pH, mesmo quando obtidos do mesmo fornecedor. Por exemplo, constatou-se que o pH do caulim de lotes e marcas diferentes pode variar de 3.7 a 6.5 e, conseqüentemente, refletir em valores de pH do SAT diferentes, inclusive ultrapassando a faixa recomendada. O pó da fibra da casca de coco, por ser matéria orgânica, também pode alterar seu pH ao longo do tempo. Recomenda-se, portanto, atenção redobrada com o pH para cada preparo de SAT, pois o pH dos componentes do SAT podem ser alterados por sua estocagem ou pela renovação do lote.

Com o pH adequado, o SAT está quase pronto para o uso, precisando ainda ter a umidade ajustada para 40-60% da CRA (Capacidade de Retenção de Água) (ISO 11268-3, 1998) para o início dos ensaios de ecotoxicidade. Este ajuste deve ser realizado com água deionizada e, quando a substância-teste for líquida, deve-se considerar a quantidade necessária da mesma para cada tratamento. Por exemplo, a metade da quantidade necessária de água para ajustar 40-60% da CRA pode ser utilizada para o pré-umedecimento do substrato no dia anterior ao início do ensaio e a outra metade pode ser utilizada para diluição dos contaminantes (quando solúveis em água). A determinação da CRA (ver seção 7.4) faz-se necessária para cada novo lote de SAT.

## 7.2 Solos de áreas contaminadas

As amostras de solos de áreas contaminadas ou de resíduos a serem testados (ex.: área industrial, agrícola, mineração, lodo industrial, lodo de esgoto, dejetos animais) devem ser secas ao ar até que seja possível peneirá-las (preferencialmente malha 2 mm). Para solos muito argilosos, provavelmente será difícil conseguir uma quantidade de solo peneirada em malha  $\leq 2$  mm com um gasto aceitável de trabalho. Neste caso, pode-se peneirar o solo com malha  $\leq 4$  mm. Antes da realização dos ensaios, deve ser realizado o ajuste da umidade para 40-60% da CRA, como descrito para o SAT.

Na avaliação de solos de locais contaminados, faz-se necessário utilizar um solo de referência natural (i.e., um *background* pedogeoquímico oriundo de uma área de referência ou de uma zona vizinha não contaminada) tão similar quanto possível ao solo-teste em todas as características físicas e químicas, exceto na presença de contaminantes. Recomenda-se determinar, no mínimo, o pH, a textura, a umidade, a CRA, a capacidade de troca catiônica, conteúdo e tipologia de argilominerais, e o carbono orgânico desses solos e, preferivelmente, eles devem ser submetidos a análises físico-químicas de rotina dos solos, seguindo métodos da Embrapa (Teixeira et al., 2017), uma vez que estes dados servirão para a interpretação dos resultados. O anexo E da norma ISO 11268-2 (ISO, 1998) sobre os ensaios de reprodução de minhocas recomenda que características do solo referência como pH, capacidade de troca catiônica, distribuição do tamanho de partículas (i.e., textura), densidade aparente, conteúdo de água, capacidade de retenção de água e biomassa microbiana sejam determinadas e apresentadas.

Nos casos em que não haja o solo de referência natural semelhante em propriedades com os solos da área contaminada, recomenda-se usar:

1. Um solo com características de acordo com a ISO 11269-2 (ISO, 1998) [carbono orgânico -  $C_{org} \leq 1,5\%$ ; conteúdo de areia (tamanho de partículas de 0,063 mm a 2 mm) de 50% a 75%, com menos de 20% de partículas menores que 0,02 mm; pH de 5 a 7,5] (ver discussão sobre solo natural padrão na seção 7.3).
2. Um solo artificial, o SAT (seção 7.1). No caso dos ensaios de fuga, as influências potenciais desses solos são abrangidas pelos critérios de avaliação de 80% (ver capítulo 13).

### 7.3 Solos naturais padrão não contaminados

Assim como a Alemanha adotou o uso de solos naturais padrão, como os Lufas, que são usados rotineiramente desde a década de 80 para vários ensaios requeridos para regulamentação de princípios ativos de agrotóxicos, no Brasil, o Ibama, por meio da Portaria Normativa nº 84 de 15 de outubro de 1996, estabeleceu que os testes de comportamento de agrotóxicos no solo (de biodegradabilidade em solos, de avaliação da mobilidade e de avaliação da adsorção/dessorção) sejam realizados com solos das seguintes classes (segundo a classificação mais atual da Embrapa; Santos et al., 2018): Latossolo vermelho, distrófico ou álico, A moderado textura média; Latossolo vermelho distroférico, A moderado, textura argilosa; ou Gleissolo melânico, Tb, A proeminente, textura média (ver Tabela 7.1 e seção 3.2). Solos brasileiros com estas características já foram utilizados em ensaios ecotoxicológicos de fuga (Stefani Junior, 2010; Sousa, 2010) e de bioacumulação em minhocas (Stefani Junior, 2010) e comprovou-se a sobrevivência e a ausência de anormalidades tanto morfológicas quanto comportamentais, assim como manutenção da capacidade de escavação das minhocas nesses solos. Um estudo realizado com minhocas *E. andrei* demonstrou que os solos recomendados pelo Ibama podem ser utilizados em ensaios de fuga e reprodução dessa espécie (Ferreira et al., 2015). Estudos sobre o possível efeito desses solos sobre outras espécies de oligoquetas ainda são necessários visto que algumas espécies, como por exemplo, a *Dichogaster annae*, podem ter sobrevivência abaixo do nível desejável em Latossolo bastante semelhante ao recomendado pelo Ibama (Cantelli, 2011).

Embora se reconheça que o uso de solos artificiais como substrato fornece informações que podem ser comparadas internacionalmente, o uso de solos

**Tabela 7.1.** Características físico-químicas dos solos recomendados pela Portaria Normativa nº 84 (Ibama, 1996).

| Classificação do solo | pH em H <sub>2</sub> O | pH em KCL | Corg (g kg) | Argila (g kg) | Densidade | Porosidade (%) |
|-----------------------|------------------------|-----------|-------------|---------------|-----------|----------------|
| Latossolos            | 4,9 a 5,3              | 3,8 a 4,8 | 15 a 40     | 580 a 700     | 1,1 a 1,5 | 50 a 65        |
| Gleissolos            | 3,5 a 5,1              | 3,0 a 4,7 | 50 a 100    | 300 a 500     | 0,8 a 1,0 | -              |

naturais de regiões agrícolas podem gerar resultados mais realísticos. A diretriz da OECD (2010) cita a possibilidade do uso de solo natural ou solo artificial como substrato para ensaios de bioacumulação em minhocas e enquitreídeos, em solos contaminados com agrotóxicos, metais ou outros compostos. De acordo com a diretriz, o solo natural deve permitir a sobrevivência e a reprodução dos oligoquetas durante os períodos de aclimação e do ensaio, sem que os organismos-teste apresentem qualquer mudança ou anormalidade na aparência e no comportamento, além de escavarem o solo normalmente.

Os solos naturais a serem usados em ensaios de ecotoxicidade devem ser tratados e analisados como descrito na seção 7.2. Antes da realização dos ensaios, deve ser realizado o ajuste da umidade dos solos para 40-60% da *CRA*, como descrito para o SAT.

## 7.4 Determinação da capacidade de retenção de água (*CRA*)

Para determinar a capacidade de retenção de água (*CRA*) do SAT ou solo natural, recomenda-se utilizar o método descrito na norma ISO 11268-2 (ISO, 1998). Recipientes específicos, que podem ser anéis largos de metal ou tubos de PVC, têm a parte inferior vedada com papel de filtro e são preenchidos com uma quantidade definida (por exemplo, 5 g) do solo-teste (natural ou artificial). Os recipientes (pelo menos três replicatas) são colocados em uma bandeja com água de modo a permitir absorção pela abertura inferior até que a água alcance a superfície do solo por capilaridade. Cuidadosamente, adiciona-se água à bandeja até que o nível da mesma esteja acima do nível do solo no interior do recipiente, e aguarda-se por três horas. Em seguida, os recipientes devem ser colocados sobre areia quartzosa fina por duas horas para a drenagem do excesso de água, uma vez que nem toda a água absorvida por capilaridade é retida nos poros do solo. Após este período, registra-se o peso do recipiente com o material úmido e posteriormente realiza-se a secagem em estufa à temperatura constante de 105 °C por 24/48 horas. Após a secagem, registra-se o peso do recipiente com o material seco. O peso úmido (*U*) e seco (*S*) do solo é obtido após descontado o peso do recipiente e do papel filtro. A capacidade de retenção de água é calculada a partir da seguinte equação:

$$CRA = [(U - S) / S] \times 100$$

onde:

*CRA* = capacidade de retenção de água, em porcentagem de massa seca (%).

*U* = peso do SAT (ou solo) úmido.

*S* = peso do SAT (ou solo) seco.

É importante destacar que, devido à grande variabilidade na granulometria no teor de matéria orgânica e na quantidade e tipologias de argilominerais, cada

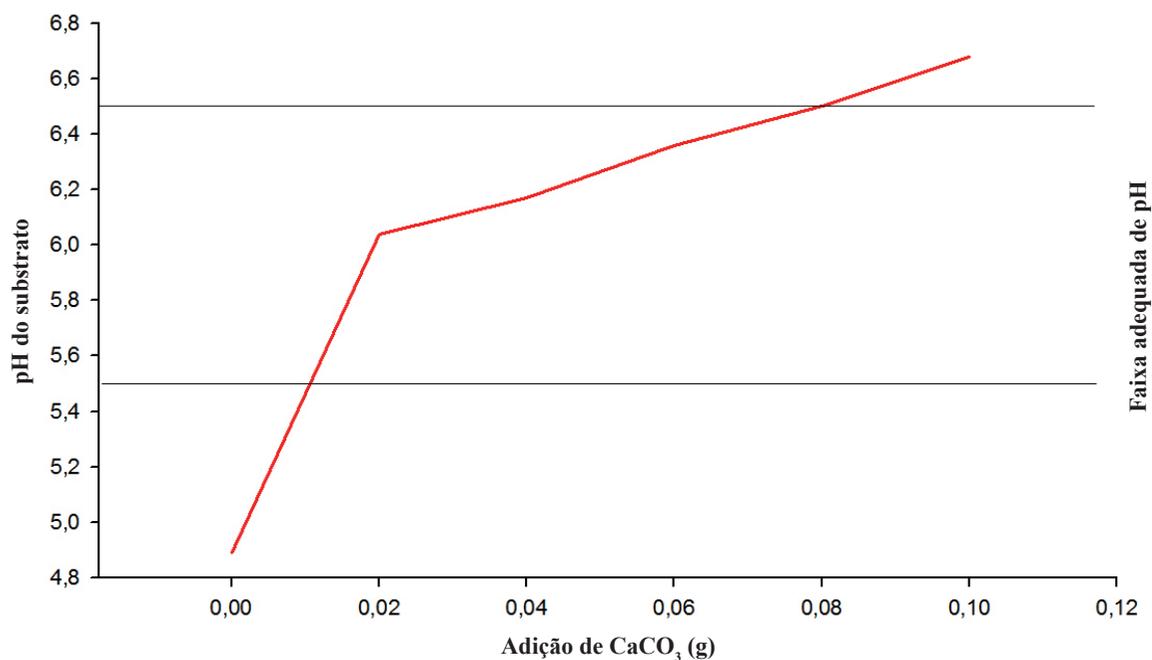
solo tem um valor específico de CRA. A umidade adequada para oligoquetas está entre 40% a 60% da CRA, segundo a norma ISO 11268-2 (ISO, 1998).

## 7.5 Determinação do pH

Para que o SAT esteja em condições ideais para a sobrevivência e a reprodução das minhocas, seu pH deve estar em  $6,0 \pm 0,5$ . Esta aferição deve ser feita quando todo o material já estiver misturado e pronto para o uso, porém, antes da adição de água ao substrato. Para isso, retiram-se diversas alíquotas de 10 g do substrato artificial para cada amostra. Em cada uma devem ser adicionadas quantidades crescentes (ex. 0; 0,2; 0,4; até 1%) de  $\text{CaCO}_3$ , o que permite determinar a quantidade necessária de  $\text{CaCO}_3$  para a correção do SAT. Após a mistura da amostra com o  $\text{CaCO}_3$ , adicionam-se 50 mL de uma solução de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,01M a cada amostra e os recipientes devem ser agitados por 5 minutos. Em seguida, esta mistura deve permanecer em repouso por 2 horas, antes de se realizar a leitura de pH, por meio de imersão do eletrodo do aparelho na suspensão. Com os valores de pH obtidos na análise do substrato, devido às diferentes concentrações de carbonato de cálcio (p.ex., Tabela 7.2), é possível construir uma curva de calibração (Figura 7.2) e corrigir a quantidade necessária de  $\text{CaCO}_3$  para que a mistura fique na faixa de pH desejada.

**Tabela 7.2.** Exemplo de calibração do pH do SAT.

| $\text{CaCO}_3$ (%) | $\text{CaCO}_3$ (g) | pH do substrato | Condição  |
|---------------------|---------------------|-----------------|-----------|
| 0,0                 | 0,00                | 4,89            | Impróprio |
| 0,2                 | 0,02                | 6,04            | OK        |
| 0,4                 | 0,04                | 6,17            | OK        |
| 0,6                 | 0,06                | 6,36            | OK        |
| 0,8                 | 0,08                | 6,50            | OK        |
| 1,0                 | 0,10                | 6,68            | Impróprio |



**Figura 7.2.** Curva de calibração do SAT demonstrando a faixa ideal do pH para a utilização em ensaios de ecotoxicidade.

A norma NBR/ISO 16387 (ABNT, 2012) recomenda a utilização de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,01M ou cloreto de potássio (KCl) 1M como veículo para medida do pH. Alguns autores também utilizam água destilada. Neste manual, indicamos a utilização de  $\text{CaCl}_2$  por ser o método mais comum em laboratórios de solo no Brasil.

## 7.6 Defaunação do solo

Quando se trabalha com solos naturais como substrato para os ensaios de ecotoxicidade, a retirada da fauna original é importante para evitar interferência de fatores não inerentes à substância-teste nos resultados, principalmente quando se trata de ensaios de reprodução que têm duração mais longa. A presença de casulos de minhocas nesses solos pode levar a resultados errôneos na contagem dos juvenis. Da mesma forma, a presença de outros organismos que possam competir com as minhocas por alimento, espaço, ou a presença de predadores e parasitas durante a execução dos ensaios podem interferir nos resultados. A mesma precaução deve ser adotada com relação aos substratos de cultivo das minhocas, bem como ao alimento a ser utilizado nos ensaios de reprodução.

Alguns processos de defaunação do solo podem interferir na biodisponibilidade dos contaminantes e, por isso, tal procedimento é motivo de controvérsia. Porém, o método que vem sendo bastante utilizado é o recomendado por Pesaro et al. (2003), com ao menos dois ciclos de congelamento de 48 horas, seguidos de descongelamento do substrato. Normalmente, o solo é congelado por este período e em seguida, mantido em temperatura ambiente por igual período de tempo, sendo este procedimento repetido por três vezes, totalizando 12 dias de defaunação. Esse procedimento também pode ser aplicado para defaunação do alimento das minhocas.

## Referências

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15537**: ecotoxicologia terrestre: ecotoxicidade aguda: método de ensaio com minhocas. Rio de Janeiro, 2007. 11 p.
- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR/ISO 16387**: qualidade do solo: efeitos de poluentes em Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência. Rio de Janeiro, 2012.
- ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION. **Qualité des soils**: détermination de la toxicité d'une substance vis-à-vis des lombriciens (espèce *Eisenia fetida*). Method "artisol". Paris, 1984. Norme NFX 31-250.
- CANTELLI, K. B. **Toxicidade aguda de carbofurano e carbendazim a minhocas em solo natural**. 2011. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- CESAR, R. G.; CASTILHOS, Z. C.; RODRIGUES, A. P.; BIDONE, E. D.; EGLER, S. G.; POLIVANOV, H. **(Eco)toxicologia de metais em solos**: conceitos, métodos e interface com a geoquímica ambiental. Rio de Janeiro: CETEM, 2014. 100 p. (Série tecnologia ambiental, 1).
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Solo**: teste de toxicidade com *Eisenia foetida* (minhoca): método de ensaio: norma técnica L6.401. São Paulo, 1990. 13 p.
- DE SILVA, P. M. C. S.; VAN GESTEL, C. A. M. Development of an alternative artificial soil for earthworm toxicity testing in tropical countries. **Applied Soil Ecology**, v. 43, p. 170-174, 2009. DOI: 10.1016/j.apsoil.2009.07.002.

DIAS, T. J.; PEREIRA, W. E.; CAVALCANTE, L. F.; RAPOSO, R. W. C.; FREIRE, J. L. O. Development and nutritional quality of *Hancornia speciosa* seedlings cultivated in mixture containing coconut fiber and fertilized with phosphorus. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 512-523, 2009. DOI: 10.1590/S0100-29452009000200028.

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

GARCIA, M.; SCHEFFCZYK, A.; GARCIA, T.; RÖMBKE, J. **The effects of the insecticide lambda-Cyhalothrin on the earthworm *Eisenia fetida* under experimental conditions of tropical and temperate regions**. Environmental Pollution, v. 159, p. 398-400, 2011. DOI: 10.1016/j.envpol.2010.10.038.

GARCIA, M. V. B. **Effects of pesticides on soil fauna**: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. 2004. 283 f. Thesis (Ph.D.) - University of Bonn, Bonn.

GOMES, M. A. F.; ESPADOTTO, C. A. **Subsídio à avaliação de risco ambiental de agrotóxicos em solos agrícolas brasileiros**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 5 p. (Embrapa Meio Ambiente. Comunicado técnico, 11).

Ibama. **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. Parte D.5.1: avaliação de toxicidade para organismos do solo: minhocas. Brasília, DF, 1990.

Ibama. Portaria Normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 out. 1996.

Ibama. **Portaria Normativa nº 139 de 21-12-1994**. Disponível em: <<https://sogi8.sogi.com.br/Arquivo/Modulo113.MRID109/Registro12764/documento%201.pdf>>. Acesso em: 22 fev. 2019.

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

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

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

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

PESARO, M.; WIDMER, F.; NICOLLIER, G.; ZEYER, J. Effects of freeze-thaw stress during soil storage on microbial communities and methidathion degradation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 1049-10618, 2003. DOI: 10.1016/S0038-0717(03)00147-0.

RÖMBKE, J.; JÄNSCH, S.; JUNKER, T.; POHL, B.; SCHEFFCZYK, A.; SCHALLNAß, H. -J. The effect of tributyltin-oxide on earthworms, springtails and plants in artificial and natural soils. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, p. 525-534, 2007. DOI: 10.1007/s00244-006-0099-y.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; DOS ANJOS, L. H. C.; DE OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; ARAUJO FILHO, J. C.; OLIVEIRA, J. B.; CUNHA, T. J. F. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2018.

STEFANI JUNIOR, A. **Avaliação comparativa do efeito de compostos fungicidas sintético e natural por parâmetros biológicos do solo**. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo.

SOUSA, A. P. A. **Influência de três tipos de solos sobre o efeito do inseticida cipermetrina em minhocas *Eisenia andrei***. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo.

TEIXEIRA, P. C.; DONAGEMMA, G. K.; FONTANA, A.; TEIXEIRA, W. G. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. rev. e ampliada. Brasília: Embrapa, 2017. 574p.

TOMCZAK, F.; DEMETRIO, S. T. H.; SATYANARAYANA, K. G. Studies on lignocellulosic fibers of Brazil. Part II: Morphology and properties of Brazilian coconut fibers. **Composites Part A-Applied Science and Manufacturing**, v. 38, n. 7, p. 1710-1721, 2007. DOI: 10.1016/j.compositesa.2007.02.004.