
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA PAULA MANCINI COELHO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE AMOSTRAS
DE VINHAÇA E BIODISSÓLIDO NO INTESTINO
MÉDIO DE DIPLÓPODOS (*Rhinocricus
padbergi*) POR MEIO DA IMUNOMARCAÇÃO
DE PROTEÍNAS DE ESTRESSE CELULAR**

MARIA PAULA MANCINI COELHO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE AMOSTRAS DE VINHAÇA E
BIOSSÓLIDO NO INTESTINO MÉDIO DE DIPLÓPODOS
(*Rhinocricus padbergi*) POR MEIO DA IMUNOMARCAÇÃO DE
PROTEÍNAS DE ESTRESSE CELULAR

Orientador: Prof^a Dr^a Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

Co-orientador: Cristina Moreira de Sousa

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

Rio Claro
2017

574.5
C672a

Coelho, Maria Paula Mancini

Avaliação da toxicidade de amostras de vinhaça e biossólido no intestino médio de diplópodos (*Rhinocricus padbergi*) por meio da imunomarcagem de proteínas de estresse celular / Maria Paula Mancini Coelho. - Rio Claro, 2017

56 f. : il., figs., gráfs., tabs.

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

Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofoletti

Coorientador: Cristina Moreira de Sousa

1. Ecologia. 2. Ecotoxicologia terrestre. 3. Toxicidade do solo. 4. Fertilizantes. 5. Milípedes. 6. Imuno-histoquímica. 7. HSP70. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

*Aos meus pais, irmão e avós
(in memoriam), dedico este
trabalho com carinho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, por me iluminar e colocar em meu caminho pessoas com as quais pude contar ao longo desta jornada.

Aos meus pais Daniela e Cícero, pelo amor incondicional e por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui e realizasse meu grande sonho. Obrigada por me darem esperança, força e capacidade de seguir em frente nos momentos de dificuldade e grande saudade. À minha madrastra Thaís, por todo o carinho e suporte ao longo destes anos. Ao meu padrasto Paolo, por todo o amor, incentivo e por sempre se fazer presente de um modo tão especial. Ao meu querido irmão Lucas, pela amizade e carinho.

Ao meu namorado, Lucas, por todo o amor, cumplicidade, companheirismo, paciência e aprendizados ao longo destes três anos. Obrigada de coração por sonhar este sonho comigo e fazer com que eu acreditasse que tudo daria certo apesar de todos os obstáculos que surgiram. Amo você!

Às minhas queridas amigas Nayara, Letícia, Ana Cláudia, Andressa, Isabelle e Letícia (afilhada) por estarem sempre ao meu lado e provarem que a distância é insignificante quando o sentimento é verdadeiro. Sou muito grata por ter cada uma de vocês em minha vida!

Ao mais belo presente que recebi na UNESP e que sempre estará em meu coração: o quarteto Camila, Letícia, Lidia e Louise. Obrigada por me cativarem e por terem sido amparo, direção, assim como motivo de muitos dos meus maiores sorrisos. Vocês me acompanharam desde o início desta caminhada e são parte essencial desta conquista!

À minha turma, CB13, por tudo o que vivenciamos e compartilhamos ao longo da graduação. Foram cinco anos que carregarei pela vida graças também a vocês!

Agradeço de modo especial à minha orientadora Prof.^a Dr.^a Carmem e co-orientadora Cris, por todo o aprendizado, dedicação e amizade. Obrigada por me acolherem e aceitarem este grande desafio comigo. Vocês contribuíram de forma imensurável para a minha formação pessoal e profissional.

Ao nosso grupo de pesquisa, Annelise, Bairral, Camila, Chapinha, Cintya, Cleiton, Cris, Jorge, Louise, Luiza, Matraca, Mônica, Thays, Vinícius e Yadira. Agradeço pelo convívio e pelo auxílio imprescindível no desenvolvimento deste e dos demais trabalhos.

Ao técnico Gerson Mello, pelos valiosos ensinamentos e auxílios na rotina laboratorial.

Por fim, meus sinceros agradecimentos às instituições:

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Rio Claro.

Ao Instituto de Biociências, Departamento de Biologia e aos Laboratórios de Histologia e Mutagênese Ambiental, por fornecerem a estrutura necessária à realização deste estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos concedida (Processo nº: 2014/12646-5).

*“As coisas tangíveis tornam-se insensíveis à palma da mão.
Mas as coisas finas, muito mais que lindas, essas ficarão”.*

Carlos Drummond de Andrade.

*“Das moscas de frutas às doenças autoimunes e ao câncer,
as proteínas chaperonas são as moléculas maravilhosas
cativando a imaginação de pesquisadores em toda a
comunidade científica. Muitas novas avenidas serão abertas
através do estudo e do entendimento da resposta celular ao
estresse. Estamos apenas começando a portentosa aventura
que aguarda nosso descobrimento de como as células lidam
com o estresse. ”*

Wynn et al, 1994

RESUMO

Grandes quantidades de resíduos diariamente gerados pelas atividades agrícolas, urbanas e industriais são disponibilizadas no solo e por esta razão uma atenção especial tem sido destinada a essa prática, devido aos problemas ambientais ocasionados por essa disposição. Este estudo teve por objetivo avaliar o potencial tóxico da vinhaça de cana-de-açúcar, subproduto da indústria sucro-alcooleira, e do bio sólido, resíduo gerado pela Estação de Tratamento de Esgoto (ETE), ambos comumente empregados como fertilizantes. A avaliação foi feita por meio de bioensaios em um animal típico de solo, o diplópodo da espécie *Rhinocricus padbergi*, exposto a solos contendo tais resíduos em concentrações compatíveis com as normas brasileiras para a aplicação na agricultura. Foram realizadas análises semiquantitativas da imunomarcação das proteínas de estresse celular da família HSP70 no intestino médio dos diplópodos. A resposta dos organismos diante da presença dos xenobióticos de ambos resíduos foi um aumento considerável da expressão das proteínas HSP70, em regiões celulares com funções de detoxificar o órgão, como a camada de células hepáticas, bem como regiões específicas de células presentes no epitélio. Foi observada maior imunomarcação na exposição à vinhaça em relação ao bio sólido. Concluiu-se que as substâncias presentes nos resíduos testados apresentaram ação proteotóxica para os animais expostos e induziram resposta citoprotetora, levando a uma maior imunomarcação de proteínas de estresse celular e, portanto, sugere-se cautela na disposição de tais resíduos na agricultura.

Palavras-chave: Toxicidade do solo; fertilizantes; milípedes; imuno-histoquímica; HSP70.

ABSTRACT

Large amounts of residues generated by agricultural, urban and industrial activities are dumped daily on the soil. This practice deserves special attention because it causes serious environmental problems. This study evaluated the toxic potential of the sugarcane vinasse, a byproduct of the sugar-alcohol industry, and the biosolid, a residue produced by wastewater treatment plants, both widely used as fertilizers. The evaluation was performed through bioassays using a typical soil bioindicator, the diplopod *Rhinocricus padbergi*. The specimens were exposed to soils containing these residues in concentrations that are compatible with the Brazilian regulation for agricultural use. Semi-quantitative immunolabelling analyses of the stress protein HSP70 were performed on the midgut of the studied diplopods. There was a significant increase in the immunolabelling of HSP70 proteins as a response to xenobiotics from both residues, particularly in regions where the function of the cells is the detoxification of the organ (e.g. the hepatic cell layer and specific regions of the epithelium). Higher immunolabelling was observed in the specimens exposed to vinasse in comparison with the biosolid exposure. This demonstrates that the substances in the tested residues had proteotoxic action in the exposed animals and induced a cytoprotective response, which led to higher stress protein immunolabelling. Therefore, caution is needed for the use of such residues in agriculture.

Keywords: Soil toxicity; fertilizers; millipedes; *R. padbergi*; immunohistochemistry; HSP70.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 A problemática da contaminação dos solos	14
2.2 Diplópodos como bioindicadores	16
2.3 A família de proteínas de estresse celular HSP70	19
3 OBJETIVOS	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 <i>Rhinocricus padbergi</i>	26
4.2 Solo controle	26
4.3 Vinhaça	26
4.4 Biossólido	26
4.6 Caracterização química das amostras	27
4.7 Cálculos para a aplicação de vinhaça, segundo a norma P4.231, da CETESB	27
4.8 Cálculos para a aplicação do lodo de esgoto, segundo a resolução CONAMA 375/2006	28
4.7.1 Preparação das amostras de solo e resíduos para montagem dos bioensaios com <i>R. padbergi</i>	28
4.8 Dissecção dos animais	29
4.9 Imuno-histoquímica do intestino médio	29
4.10 Análises imuno-histoquímicas	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO	42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

O impacto da disposição final dos resíduos gerados diariamente em escala exponencial pelas atividades urbanas, industriais e agrícolas sobre os ecossistemas terrestres e aquáticos consiste em um grave problema ambiental. Nesse sentido, a intervenção humana pode ser considerada como a maior responsável pela magnitude e frequência da disposição de compostos potencialmente contaminantes, gerando diversos danos em nível local e global (BRAYNER, 1998). Assim, uma vez que cada resíduo apresenta propriedades e efeitos específicos na biota, é imprescindível avaliar sua contribuição à contaminação do meio (SRIVASTAVA; SAHAI, 1987).

No entanto, a detecção e quantificação das substâncias tóxicas neles contidas é uma tarefa trabalhosa e problemática, devido principalmente à complexidade das substâncias químicas envolvidas, sendo necessários estudos complementares às análises físico-químicas para distinguir os compostos inertes daqueles que são contaminantes. Sendo assim, os testes de toxicidade, ao utilizarem organismos bioindicadores, têm se revelado importantes na avaliação dos riscos que estes resíduos apresentam à saúde humana e ao meio ambiente (COSTA et al., 2008; FONTANETTI et al., 2011).

Dentre os resíduos orgânicos produzidos em larga escala, destacam-se a vinhaça de cana-de-açúcar, derivada da indústria sucro-alcooleira, e o lodo proveniente das estações de tratamento de esgoto (ETEs), cujas destinações em cursos d'água e oceanos, respectivamente, causaram importantes desastres ecológicos, levando a implantação de legislações restritivas, que proibiram esta prática em vários países a partir das décadas de 60 e 70 (LARA et al., 2007; FYTILI; ZABANIOTOU, 2008; LAIME et al., 2011). Uma alternativa vantajosa economicamente e prática, que passou ser utilizada, foi a aplicação destes subprodutos na agricultura, como fertilizantes e recondicionantes do solo, principalmente devido à elevada concentração de matéria orgânica e por serem fontes consideráveis de nutrientes vegetais (LOPES, 2008; CHRISTOFOLETTI et al., 2013a). Deste modo, a potencial contaminação dos solos por estes resíduos torna-se uma preocupação relevante, apesar de poucos estudos terem sido realizados a este respeito.

A vinhaça, também denominada restilo ou vinhoto, caracteriza-se como a principal água residuária gerada no processo de produção do etanol, especificamente durante a etapa de destilação da mistura alcoólica resultante da fermentação da matéria-prima utilizada, como a cana-de-açúcar (FUESS, 2013). Sua composição é bastante variável e depende, principalmente, da natureza e composição da matéria prima (que se modifica ao longo das safras) e do tipo de

processamento (sistema de preparo do mosto, método de fermentação, tipo de levedura utilizado, modo de destilação, entre outros) (GLÓRIA; ORLANDO, 1984; SILVA et al., 2007; NETO, 2008). Em geral, é caracterizada pelo pH ácido, elevadas carga orgânica, demanda química de oxigênio (DQO) e demanda biológica de oxigênio (DBO), coloração castanho escuro e um odor desagradável aos seres humanos (WALISZEWSKI et al., 1997; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011; MORAN-SALAZAR et al., 2016).

Embora o Brasil seja um grande produtor de açúcar desde o período colonial, a maior expansão de cultivo da espécie ocorreu durante a década de 80, impulsionado pelo incentivo estatal do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), que substituiu parte do consumo de gasolina por etanol, obtido a partir da cana-de-açúcar, sendo pioneiro em seu uso, em larga escala, em nível mundial, como combustível automotivo (LAIME et al., 2011). Este programa foi criado na tentativa de superar a crise do petróleo e atender a demanda dos mercados interno e externo, colaborando também para diminuir o consumo de combustíveis fósseis, recursos não renováveis cuja queima potencializa o efeito estufa (GUPTA; VERMA, 2015).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2017), o Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, atrás apenas dos Estados Unidos da América, sendo que, na safra de 2016/2017, a produção foi de cerca de 27,25 bilhões de litros (UNICA, 2017). Apenas o estado de São Paulo possui 5,7 milhões de hectares com cana-de-açúcar, o equivalente a mais de 50% de todo o Brasil. Assim, estima-se que São Paulo produza no mínimo 15 milhões de litros de álcool e, ao menos, 150 milhões de litros de vinhaça (FONTANETTI; BUENO, 2017), sendo que, em média, 10 a 18 litros de vinhaça são gerados para cada litro de etanol produzido, dependendo do equipamento da destilaria (CORTEZ et al., 1992; SILVA et al., 2007). Assim, a indústria sucroalcooleira ganhou destaque não apenas na economia, como também na questão ambiental, devido ao enorme volume de resíduos gerados (PAOLIELLO, 2006).

O uso da vinhaça como fertilizante, por meio da fertirrigação, ou seja, infiltração deste efluente *in natura* no solo, por meio da irrigação das próprias culturas de cana-de-açúcar se tornou frequente entre as usinas a partir também da década de 80, substituindo o emprego de fertilizantes químicos, principalmente daqueles que fornecem o suprimento de potássio (CORAZZA, 1999). Em 2014, dos cerca de 280 bilhões de litros de vinhaça produzidos, 97% foram utilizados na própria lavoura (MORINI et al., 2017).

De fato, diversos estudos (CANELLAS et al., 2003; BARROS et al., 2010; JIANG et al., 2012; YANG et al., 2013; DA SILVA et al., 2014), revelaram as vantagens desta prática,

devido ao alto teor da vinhaça em água e nutrientes minerais essenciais às plantas, como potássio, nitrogênio e fósforo, podendo promover a melhora das propriedades físico-químicas e hidráulicas do solo, como aumento da agregação de partículas, capacidade de troca catiônica, retenção de umidade e resultados positivos na produtividade dos cultivos de cana-de-açúcar, assim como de outras culturas. Contudo, há aspectos negativos, ainda não totalmente esclarecidos, os quais requerem estudos adicionais antes de possibilitar a aplicação segura da vinhaça (SOTO et al., 2017).

Existem vários trabalhos apresentando os efeitos tóxicos da vinhaça *in natura*, para os organismos aquáticos (MARINHO et al., 2014; SILVA et al., 2015; CORREIA et al., 2017a, b), uma vez que a aplicação de um grande volume de vinhaça pode saturar o solo e contaminar recursos hídricos próximos das culturas (SILVA et al., 2007). Porém pouco se tem conhecimento a respeito dos impactos deste líquido residual sobre a fauna edáfica (ALVES et al., 2015).

No Brasil, a norma técnica P4.231 (CETESB, 2015) estabelece critérios e procedimentos para a aplicação de vinhaça de cana-de-açúcar em solos agrícolas. Para tanto, o volume máximo de vinhaça para aplicação deve ser estimado levando-se em consideração a capacidade de troca catiônica (CTC) do solo, a concentração de potássio no solo e na vinhaça e a quantidade de K_2O extraída pela cultura da cana-de-açúcar por hectare após cada colheita (CETESB, 2015). Embora esses critérios sejam considerados suficientes para cumprir os objetivos estabelecidos na norma padrão, eles não consideram os efeitos biológicos derivados da aplicação da vinhaça e o comprometimento dos serviços ecológicos associados (ALVES et al., 2015).

Da mesma forma, o lodo de esgoto (LE), resíduo gerado pelas estações de tratamento de águas residuárias municipais, industriais e provenientes do próprio processamento industrial da cana-de-açúcar, também têm causado preocupações para a comunidade científica, quanto a sua disposição, tanto no cenário internacional, como no Brasil, diante de sua elevada e crescente produção, podendo representar até metade do custo operacional das Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) (PIRES, 2006). Segundo Bettiol et al. (2006), em função da origem, do tipo e da eficiência do processo utilizado, o LE apresenta uma composição muito variada. Um LE típico apresenta 40% de matéria orgânica, 4% de nitrogênio 2% de fósforo e 0,4% de potássio, além de alguns micronutrientes como ferro, cobre, zinco e manganês.

O Brasil possui uma produção anual de cerca de 150 a 220 mil toneladas de matéria seca de lodo de esgoto (PEDROZA et al., 2010). No estado de São Paulo, onde 75,8% das cidades

apresentam tratamento de esgoto (IBGE, 2010), a geração deste resíduo já ultrapassou 100 toneladas de LE seco por dia (OLIVEIRA, 2000).

A fim de reduzir a disposição do lodo de esgoto em aterros sanitários, devido aos importantes impactos negativos desta ação, os governos têm incentivado sua reutilização como fertilizantes em áreas agrícolas (PASSUELLO et al., 2012), dado que este resíduo contém teores elevados de matéria orgânica e inúmeros micronutrientes (zinco, cobre e ferro), capazes de incrementar os níveis de fertilidade, porosidade, permeabilidade e agregabilidade dos solos (SURTHAR; SINGH, 2008; CINCINELLI et al., 2012). Entretanto, a presença de metais traço, contaminantes orgânicos, patógenos e produtos farmacêuticos no lodo constitui a principal restrição a este tipo de emprego (OBBARD, 2001; BRIGHT; HEALEY, 2003; CAI et al., 2007, VERLICCHI; ZAMBELLO, 2015).

Para a aplicação no solo, o LE deve ser tratado por meio dos processos de secagem, solarização, compostagem, vermicompostagem e caleação, resultando no composto denominado bioestabilizado (NASCIMENTO et al., 2011). Contudo, os processos de tratamento utilizados nem sempre são capazes de remover tais compostos (SHINBROT, 2012; BRISOLARA; OCHOA, 2016), podendo causar sérios prejuízos à saúde dos ecossistemas terrestres e aquáticos, sendo este último por meio dos processos de lixiviação (CESAR et al., 2010). De fato, estudos conduzidos por Christofolletti et al. (2012), utilizando o vegetal *Allium cepa* e o milípede *Rhinocricus padbergi*, e por Groth et al. (2016), utilizando o vegetal aquático *Lemna minor* e o crustáceo *Latonopsis australis*, como bioindicadores, indicaram os potenciais genotóxico e tóxico deste resíduo para estas espécies, mesmo após tratamento.

A regulamentação do uso do lodo de esgoto e derivados (como o bioestabilizado) no Brasil é feita pela resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA 375/2006. Esta resolução determina o modo de aplicação de tais resíduos, além de métodos de caracterização de pH, compostos orgânicos, metais, sólidos voláteis, patógenos, entre outros. Contudo, apenas sua caracterização química não é suficiente, havendo a necessidade de também prever o efeito combinado dos contaminantes, sua biodisponibilidade e toxicidade para a biota, a fim de, possibilitar a determinação de doses que promovam maior eficiência em produtividade, sem causar a contaminação do ambiente (NATAL-DA-LUZ et al., 2011).

Desse modo, estudos que utilizem organismos bioindicadores para avaliar os riscos ecotoxicológicos associados ao emprego de misturas complexas de contaminantes em solos agrícolas são fundamentais. Dentre os bioindicadores da fauna edáfica, destacam-se os diplópodos em razão da importância destes organismos nos processos de ciclagem de nutrientes

e estruturação dos solos e ao fato de estarem constantemente expostos aos contaminantes deste meio (SOUZA et al., 2014).

A avaliação dos efeitos biológicos dos contaminantes ambientais pode ser realizada em vários níveis de organização, sendo que as técnicas que revelam respostas em níveis mais baixos são consideradas mais preventivas, fornecendo, por exemplo, um aviso antecipado de risco ambiental (NASCIMENTO et al., 2008). Assim, uma ferramenta que tem mostrado ser cada vez mais eficiente nos estudos de toxicidade, é o uso de marcadores celulares, como as proteínas de choque térmico (*Heat Shock Protein* – HSP) também conhecidas como proteínas de estresse celular (MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006). As HSPs exercem um importante papel citoprotetor contra danos e na manutenção de muitas funções celulares vitais (MUKHOPADHYAY et al., 2003; DANISH et al., 2015). A família HSP70 em especial, é reconhecida como um importante biomarcador por sua expressão ser geralmente aumentada em resposta a vários estressores ambientais, atuando como ativadoras da desintoxicação metabólica e prevenindo a indução da morte celular (NADEAU et al., 2001; KRONE et al., 2005; SOUZA et al., 2014; RAHUL et al., 2015).

Neste contexto, considerando a importância dos solos e a problemática da contaminação deste recurso por resíduos utilizados como fertilizantes, tais como a vinhaça de cana-de-açúcar e o bio-sólido, assim como a relevância dos marcadores celulares, esse estudo teve por objetivo avaliar o potencial tóxico destes compostos sobre um organismo representante da fauna edáfica utilizando a imunomarcagem de proteínas de estresse celular HSP70.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A problemática da contaminação dos solos

O solo consiste na camada superior da crosta terrestre composta por materiais minerais ou orgânicos não consolidados, com diferentes propriedades físicas, químicas, morfológicas e biológicas (SSA, 2008) e compõe-se por fases aquosa, sólida e gasosa (LUCHESE et al., 2001). É um sistema dinâmico, complexo e fundamental para a vida na Terra, que atua como um reservatório chave de grande parte da biodiversidade global, desde micro-organismos à flora e à fauna (FAO, 2015a; MONTANARELLA et al., 2015), assim como fornece o substrato físico para a maioria das atividades humanas. Nesse contexto, a biota do solo é um componente central na regulação das principais funções deste sistema, como a decomposição de matéria orgânica, o ciclo de nutrientes e a manutenção da estrutura do solo (BARRIOS, 2007).

Nas últimas décadas, o solo tem sido constantemente negligenciado e deteriorado devido à contaminação química, manejos agrícola e florestal inadequados, erosão, entre outros (SOCHOVÁ et al., 2006), levando ao declínio de sua função e capacidade de fornecer bens econômicos e serviços ecossistêmicos, como a produção de alimentos e o sequestro de carbono (LIU et al., 2010; LAL, 2010). Assim, este quadro gerou recentemente um maior interesse na conservação deste limitado recurso, principalmente no contexto da segurança alimentar, mudanças climáticas e gestão de terra (KOCH et al., 2013; LAL, 2004; KEITH et al., 2016). A exemplo disso, as Nações Unidas declararam 2015 o Ano Internacional dos Solos com o lema “solos saudáveis para uma vida saudável” a fim de evidenciar o papel fundamental dos solos na sustentação da produtividade biológica, promoção da qualidade ambiental e manutenção da vida (FAO, 2015b; POWELL; EISENHAUER, 2015).

De fato, o manejo não apropriado de agroquímicos, águas de irrigação de baixa qualidade ou contaminada, bem como a disposição indiscriminada de resíduos gerados pelas atividades agrícolas, urbanas e industriais podem provocar o acúmulo de substâncias potencialmente tóxicas aos organismos do solo e conseqüentemente, afetar os seres humanos por meio das rotas de transferência ao longo da cadeia alimentar (CAMARGO; DENARDIN, 2013; FRANCISCO; FONTANETTI, 2015). Além disso, estes contaminantes podem atingir os recursos hídricos subterrâneos ou superficiais ao permearem as camadas do solo no processo de percolação, ou serem transportados por lixiviação, tornando esta problemática ainda maior (SILVA et al., 2007; SOTO et al., 2015; PRADO et al., 2016).

A mobilidade dos poluentes no solo e, portanto, a sua biodisponibilidade e transferência para outros compartimentos ambientais (a atmosfera e os corpos d'água), é determinada pela natureza química do poluente (solubilidade, polaridade, hidrofobicidade, lipofilicidade e estrutura molecular), pelas características da carga da superfície coloidal do solo (a qual influenciará a solubilidade, troca de íons por processos de adsorção-dessorção, complexação e reações redox dos poluentes ativos na solução do solo) e pelas suas propriedades físicas (textura, distribuição de poros, densidade, temperatura, aeração, regime hídrico do solo e topografia ou declividade da área) (SANTOS, 2002; SEMPLE et al., 2003; ARIAS-ESTÉVEZ et al., 2008). Dentre estes complexos processos, destacam-se: sorção e degradação.

A sorção é um processo chave na dinâmica do transporte, persistência, transformação e bioacumulação dos contaminantes (DE JONGE et al., 1996). Uma vez que na maioria dos solos há o predomínio de cargas negativas, cátions minerais e orgânicos são atraídos eletrostaticamente para a superfície dos colóides do solo. Nos solos de carga variável, a retenção de íons orgânicos e inorgânicos da solução do solo depende da adsorção-dessorção de hidrogênio de grupos funcionais de minerais e da matéria orgânica. Enquanto metais de transição e metais pesados são fortemente adsorvidos por ligações químicas a esses colóides, resultando em um longo período de contaminação (SANTOS, 2002).

A degradação dos contaminantes refere-se a mudanças na natureza química da molécula e pode ocorrer por via abiótica (hidrólise, oxi-redução, volatilização e fotodecomposição) e caso o composto seja biodegradável e se encontre na solução do solo ou fracamente adsorvido, por via biótica (ação de micro-organismos, vermicompostagem e bioprocessamento) (REID et al., 2000, SANTOS, 2002; CHRISTOFOLETTI et al., 2013b). Este é um relevante processo de atenuação de contaminantes como pesticidas e herbicidas, determinando seu tempo de permanência no solo (GUO et al., 2000; OLIVEIRA; BRIGHENTI, 2011). Porém, em alguns casos, subprodutos mais tóxicos que os compostos originais podem ser gerados como resultado de sua degradação (BOXALL et al., 2004).

Atualmente, a avaliação de risco de solos degradados baseia-se principalmente em análises químicas de uma lista prioritária de substâncias tóxicas, geralmente metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e alguns outros compostos químicos persistentes, corrigidas pela quantidade total de matéria orgânica e inorgânica presente nas amostras do solo (SOUSA et al., 2008). No entanto, deve-se considerar que a grande gama de produtos químicos tóxicos potencialmente presentes em um local pode dificultar análises

químicas bem-sucedidas, tornando-a uma tarefa complexa e custosa (WHITE; CLAXTON, 2004; FONTANETTI et al., 2011).

Assim, embora os métodos analíticos tenham sido utilizados para identificar poluentes e determinar seu nível de concentração no solo, estes não foram capazes de caracterizar com precisão a qualidade geral do solo (HENTATI et al., 2013). De fato, estes resultados apresentam uma aplicação ambiental limitada, uma vez que não detectam os efeitos sobre os organismos nem avaliam as possíveis interações (aditivas, antagônicas ou sinérgicas) entre as substâncias, bem como a sua biodisponibilidade (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008; SOUSA et al., 2008; NATAL-DA-LUZ et al., 2011). Além disso, deve-se considerar que alterações qualitativas e quantitativas na fauna edáfica afetam as funções do solo (CHRISTOFOLETTI et al., 2013b) e que as concentrações totais de contaminantes nem sempre se correlacionam com a toxicidade (ALEXANDER, 2000; PEIJNENBURG et al., 2012).

Nesse sentido, recomenda-se uma combinação de metodologias de análises químicas e biológicas, tanto laboratoriais quanto em campo, na avaliação da toxicidade de solos para se obter uma abordagem ecossistêmica real do risco associado a este tipo de contaminação (ALMUTAIRI et al., 2008; SOUZA et al., 2013). Deste modo, a ecotoxicologia do solo fornece suporte científico para o esforço de proteger este meio através do estudo das relações entre a contaminação e seus efeitos sobre importantes organismos da fauna edáfica (SOCHOVÁ et al., 2006).

2.2. Diplópodos como bioindicadores

Uma espécie ou um grupo de espécies cuja presença, abundância e condições biológicas, em ecossistemas reais ou através de testes de toxicidade laboratorial, permitem realizar inferências sobre a qualidade e o impacto das alterações em um ambiente, são considerados bioindicadores (McGEOCH, 1998; SOUZA et al., 2014). Dentre os organismos do solo, alguns grupos taxonômicos de invertebrados que pertencem à meso (80 μm -2 mm) e macrofauna (500 μm -50 mm) (SWIFT et al., 1979), tais como, Isopoda, Collembola, Oligochaeta e Diplopoda, têm sido propostos como organismos bioindicadores na ecotoxicologia terrestre (FONTANETTI et al., 2011). Isto se deve a uma série de características destes organismos, como o habitat, distribuição cosmopolita, abundância e diversidade, além de muitas vezes apresentarem curtos ciclos de reprodução, o que torna prático seu uso em testes laboratoriais (HUGUIER et al., 2014).

A classe Diplopoda (milípedes) em particular, considerada a terceira maior classe de artrópodes terrestres, é estimada em 80.000 espécies distribuídas em todo o mundo (com maior diversidade nos trópicos), das quais apenas cerca de 12.000 foram descritas (RUPPERT et al. 2005; GOLOVATCH; KIME, 2009). Uma característica que distingue os membros dessa classe em relação às outras três classes de Myriapoda (Chilopoda, Symphyla e Pauropoda) é a presença de segmentos duplos, portando dois pares de pernas (CORREIA; DE AQUINO, 2005).

Seus hábitos são predominantemente noturnos, vivendo em ambientes úmidos e são comumente encontrados sob troncos de árvores e folhas caídas. Ocupam o nível trófico de decompositores, alimentando-se de matéria orgânica, detritos, frutas e uma quantidade relativa de matéria de origem mineral (HOPKIN; READ, 1992; RUPPERT et al., 2005).

Os diplópodos possuem um importante papel na dinâmica dos ecossistemas terrestres, sendo capazes de colonizar diferentes camadas do solo. Ao participarem da ciclagem e liberação de nutrientes na matéria orgânica em decomposição, auxiliam no processo de humificação. Além disso, através de suas fezes, promovem a mineralização do solo, pois secretam amônia e ácido úrico, que quando degradados, enriquecem o meio com nitratos (SCHUBART, 1942, GODOY; FONTANETTI, 2010). Deste modo, eles estimulam o metabolismo microbiano, essencial para ciclagem de nutrientes, como carbono, nitrogênio e fósforo, e promovem a aeração ativa do solo (HOPKIN; READ, 1992).

Ademais, as atividades de escavação dos diplópodos afetam as propriedades físicas dos solos, alterando características como porosidade, umidade e transporte de substâncias (DANGERFIELD et al., 1991). Segundo Wolters (2000), sua capacidade em contribuir para o acúmulo da matéria orgânica do solo, aumentando a sua estabilidade, pode ter sido uma importante adaptação à necessidade de aumentar a qualidade do solo mineral como um habitat e garantir um "refúgio de decomposição".

Nos últimos 20 anos, estes organismos da fauna edáfica receberam maior atenção nos estudos em ecotoxicologia por uma série de motivos, entre os quais destacam-se: seu grande contato com o substrato, o que os torna suscetíveis à uma miríade de contaminantes ambientais que podem estar presentes no meio; assim como seu relativo fácil emprego em bioensaios e a possibilidade de mensurar os efeitos dessas substâncias em vários níveis de organização biológica (SOUZA et al., 2014; FRANCISCO; FONTANETTI, 2015). Além disso, por se situarem nos níveis mais baixos das cadeias tróficas terrestres, os diplópodos podem indicar a potencial bioacumulação dos contaminantes ao longo das teias alimentares (BURGER, 2006).

Em especial, o sucesso da espécie brasileira *Rhinocricus padbergi* na avaliação da toxicidade de substâncias complexas, foi atestada em diversos estudos utilizando exposições a diferentes concentrações de lodo de esgoto (NOGAROL; FONTANETTI, 2010; GODOY; FONTANETTI, 2010; PEREZ; FONTANETTI, 2011; BOZZATO; FONTANETTI, 2012; SOUZA; FONTANETTI, 2012), lodo de esgoto e vinhaça de cana-de-açúcar (CHRISTOFOLETTI et al., 2016), a solo de landfarming proveniente de refinarias de petróleo (SOUZA et al., 2011) e ao herbicida trifluralina (MERLINI et al., 2012). Assim, este organismo revelou-se um excelente bioindicador para avaliar a qualidade do solo (SOUZA; FONTANETTI, 2011; SOUZA et al., 2014).

Em relação à contaminação do solo por metais traço, por exemplo, Hubert (1978; 1979) identificou as estruturas onde tais íons metálicos são armazenados pelos diplópodos. Comumente, os grânulos contendo metais encontram-se associados a órgãos com funções digestória, de armazenamento e de excreção, como o intestino médio, células hepáticas, corpo gorduroso e túbulos de Malpighi. Portanto, órgãos que apresentam tais funções essenciais têm sido preferencialmente utilizados na avaliação de alterações tissulares e celulares decorrentes de contaminação ambiental (PIGINO et al., 2005).

Assim, um dos órgãos alvo para estes estudos tem sido o intestino médio, situado após o intestino anterior e antes da região pilórica. Histologicamente, este órgão é composto por epitélio, membrana basal, camada muscular, células hepáticas e uma membrana externa que limita estas estruturas (FONTANETTI et al., 2015). Em *R. padbergi* o epitélio é classificado como pseudoestratificado, constituído por células epiteliais absorptivas intercaladas por células regenerativas e secretoras (CAMARGO-MATHIAS et al., 2004). Sua utilização em estudos ecotoxicológicos deve-se ao seu importante papel nos processos de detoxicação e excreção de xenobióticos, funcionando como uma barreira ao impedir que compostos tóxicos ou não essenciais atinjam o restante do organismo (HOPKIN et al., 1985; GODOY; FONTANETTI, 2010; NOGAROL; FONTANETTI, 2010; SOUZA et al., 2014). De fato, grânulos insolúveis de fosfato de cálcio contendo contaminantes como metais são formados nas células hepáticas e absorptivas a fim de se manter a homeostase e o balanço iônico, assim como evitar o comprometimento de todo o organismo (PEREZ; FONTANETTI, 2011; CHRISTOFOLETTI et al., 2016). Contudo, na ingestão de substratos altamente contaminados, compostos podem ultrapassar esta barreira e as células podem sofrer danos.

2.3. A família de proteínas de estresse celular HSP70

A resposta inicial de um organismo a qualquer estresse ambiental ocorre por meio de eventos bioquímicos e subjaz todos os efeitos de maior nível organizacional (CASTRO et al., 2013). Esta resposta primária de proteção celular é caracterizada essencialmente pela ativação de um grupo restrito de genes, que leva ao aumento da expressão de uma família de proteínas denominadas “proteínas de choque térmico” (do inglês *Heat Shock Protein* - HSP), ou proteínas de estresse celular (MORALES et al., 2011; KNIGGE et al., 2014).

A primeira descrição da resposta celular ao estresse foi feita por Ritossa (1962, 1964), ao observar que a exposição de células das glândulas salivares de *Drosophila melanogaster* ao aumento da temperatura promovia um novo padrão de espessamento (*puffs*) em determinados cromossomos, o qual representava sítios específicos de transcrição para a síntese destas proteínas. Contudo, a identificação destes produtos gênicos foi realizada somente após cerca de doze anos e o termo “proteínas de choque térmico” foi criado (TISSIÉRES et al., 1974).

Estudos posteriores revelaram que a resposta ao choque térmico ocorre em todos os organismos, de procariotos a eucariotos, à custa da interrupção na síntese de outras proteínas (LINDQUIST; CRAIG, 1988; NEUER et al., 2000), sendo este um dos mecanismos citoprotetores mais antigos e evolutivamente conservados encontrados na natureza (FEDER; HOFMANN, 1999). Observou-se também que, além da elevação da temperatura, uma variedade de outros fatores adversos de natureza química, física e biológica (tais como metais, poluentes orgânicos, xenobióticos, inibidores do metabolismo, osmolaridade, radicais livres, radiação ultravioleta e patógenos) podem levar à uma alteração considerável no padrão de expressão gênica e uma síntese rápida e elevada de HSPs, que passaram então a serem reconhecidas como “proteínas de estresse” (MEYER; SILVA, 1999; MUKHOPADHYAY et al., 2003; FONTANETTI et al., 2011; MAHMOOD et al., 2014).

As proteínas de choque térmico apresentam um papel crítico na recuperação do estresse a qual a célula foi submetida e na citoproteção contra subsequentes danos. Isto ocorre em razão da capacidade destas proteínas em reconhecerem polipeptídeos nascentes, regiões não estruturadas de proteínas e trechos hidrofóbicos expostos de aminoácidos. De fato, os polipeptídeos corretamente dobrados apresentam as porções hidrofóbicas de seus aminoácidos voltadas para o interior da molécula, voltam-se para o exterior, o que impede a agregação, que seria nociva para a célula (MEYER; SILVA, 1999). Por outro lado, os componentes hidrofílicos

voltam-se para o exterior, uma vez que são nestas regiões em que estão localizados os sítios de ligação das proteínas.

Desse modo, ao atuarem como chaperonas moleculares, interagem de modo reversível com outras proteínas a fim de auxiliá-las em sua correta conformação, o que possibilita que estas exerçam todas as suas atividades celulares vitais (MEYER; SILVA, 1999). Em níveis aumentados, promovem o redobramento daquelas proteínas que sofreram desnaturação parcial por estresse, além de impedir a agregação irreversível destas com outras proteínas na célula (PARSELL; LINDQUIST, 1993; NOLLEN; MORIMOTO, 2002). Já nos casos em que os danos não são passíveis de restauração, as HSPs auxiliam no processo de eliminação destas proteínas, destinando-as ao sistema proteolítico adequado (MAYER; BUKAU, 2005). Ainda, as proteínas de choque térmico auxiliam a síntese e a maturação de novas proteínas, que irão substituir aquelas danificadas pelo estresse (MEYER; SILVA, 1999).

Além de serem induzidas em condições de estresse, as HSPs são constitutivamente expressas em condições normais do ciclo celular, onde desempenham a função de manutenção da homeostase, regulando o envelhecimento de proteínas recém-sintetizadas e auxiliando seu transporte através de membranas intracelulares (HARTL; HAYER-HARTL, 2002).

Nesse contexto, as proteínas de choque térmico foram recentemente reconhecidas como determinantes fundamentais da sobrevivência celular, sendo capazes de modular a apoptose ao interagir diretamente com os componentes das vias apoptóticas intrínseca e extrínseca. Uma evidência disso é o fato de que células que não respondem ao estresse são induzidas à morte celular (SREEDHAR et al., 1999). Sendo assim, seu nível de expressão pode determinar o destino da célula e sua manipulação pode representar uma estratégia viável para o tratamento de doenças como o câncer e doenças cardíacas (GARRIDO et al., 2001; KENNEDY et al., 2014).

Estas chaperonas moleculares são classificadas em cinco famílias principais de acordo com o peso molecular aparente, homologias de sequências de aminoácidos e seus aspectos funcionais: família HSP100 (100-104 kDa), família HSP90 (82-90 kDa), família HSP70 (68-75 kDa), família HSP60 (58-65 kDa) e a família de pequenas HSP's (15-30 kDa) (MUKHOPADHYAY et al., 2003). Cada uma delas é composta por membros expressos constitutivamente ou induzidas e que são direcionados a diferentes compartimentos subcelulares (JOLY et al., 2010).

Dentre as diferentes famílias, a HSP70 é a maior e mais conservada família de proteínas de estresse celular entre todos os organismos, assim como a mais extensivamente estudada

(KIANG; TSOKOS, 1998; KNIGGE et al., 2014; HAN et al., 2016). As HSP70 são constitutivamente expressas em uma variedade de compartimentos celulares: citoplasma, retículo endoplasmático (RE), mitocôndrias e cloroplastos (BOORSTEIN et al., 1994) e se ligam às proteínas alvo para regular o enovelamento, o transporte e o reparo de proteínas recém-sintetizadas nos complexos ribossomais (MUKHOPADHYAY et al., 2003). Sob condições ambientais adversas, sua síntese é aumentada e passa a assumir novos papéis relacionados à proteção das células contra a proteotoxicidade de agentes estressores (HIGHTOWER, 1991; BHARGAV et al., 2008; DOUGLAS; CYR, 2009). Sendo assim, estes níveis aumentados podem ser interpretados como resultantes da ação proteotóxica de xenobióticos incorporados, os quais não foram eliminados pelos processos de desintoxicação e, conseqüentemente, afetam o dobramento correto de proteínas nativas (SANDERS; MARTIN, 1993), e conseqüentemente, a função delas.

Nesse sentido, como as HSP70 são proteínas bem caracterizadas, presentes em todos os organismos, altamente conservadas em forma e função, e a modulação de sua expressão está estritamente ligada à presença de proteínas danificadas ou desenoveladas, causada por uma grande variedade de estressores, esta família de proteínas tem sido considerada um eficiente biomarcador para a avaliação do risco ambiental (NADEAU et al., 2001; KRONE et al., 2005; SOUZA et al., 2014; RAHUL et al., 2015), além de objeto de estudo para o tratamento de uma grande variedade de doenças humanas (POWERS; WORKMAN, 2007).

Por outro lado, apesar de seu grande potencial como biomarcador na ecotoxicologia, pouco se sabe sobre esta família de proteínas em invertebrados do solo (KAMMENGA et al., 2000). Neste contexto, uma maior atenção tem sido dada a nemátodos, anelídeos e gastrópodes e poucos estudos foram realizados utilizando diplópodos (ECKWERT et al., 1994; ZANGER et al., 1996; MAHMOOD et al., 2014). Por exemplo, Zanger et al. (1996) e Zanger e Köhler, (1996) observaram um aumento na expressão de HSP70 no intestino médio de diplópodos da espécie *Julus scandinavius* expostos a diferentes concentrações de cádmio e zinco. De modo geral, verificou-se que a resposta ao estresse celular em invertebrados de solo tanto em condições de laboratório quanto de campo, é especialmente adequada para indicar os efeitos da exposição a concentrações relativamente baixas de uma série de substâncias tóxicas, indicando danos subletais que os organismos tenham sofrido (RYAN; HIGHTOWER, 1996; MAHMOOD et al., 2014).

As HSP70 consistem em um domínio N-terminal de 43 kDa com atividade ATPase (*nucleotide binding domain* - NBD) e um domínio C-terminal de 27 kDa de ligação ao substrato

(*substrate binding domain* - SBD), os quais são unidos por uma ligação hidrofóbica flexível altamente conservada. O domínio NBD é composto por quatro subdomínios (IA, IB, IIA e IIB) dispostos em dois lóbulos com uma fenda profunda entre eles. Já o domínio SBD apresenta uma única dobra e é subdividido em uma estrutura β -sanduíche de duas camadas de folhas β antiparalelas (SBD β) e um subdomínio α -helicoidal (SBD α) que termina em um trecho não estruturado de 30 resíduos e apresenta arranjos radicalmente diferentes nas conformações fechada e aberta. Seu acesso ao substrato é controlado por uma “tampa” C-terminal que expõe o sítio de ligação aos peptídeos (Figura 1) (CASTRO et al., 2013; MAYER, 2013).

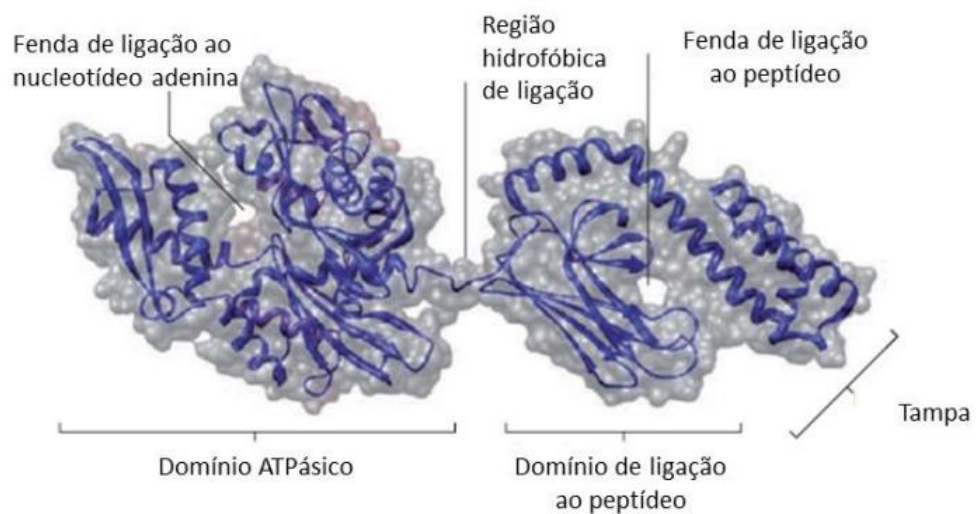


Figura 1. Estrutura molecular da proteína HSP70 com domínio ATPase (NBD) e domínio de ligação ao substrato (SDB) ligados por uma sequência hidrofóbica. Fonte: Adaptado de Kampinga; Craig, 2010.

Atuam como chaperonas moleculares auxiliando no processo de enovelamento de proteínas por meio da associação transitória do domínio SBD com o substrato proteico (MAYER; BUKAU, 2005). Dentre as possíveis conformações do substrato estão: polipeptídeos desenovelados ou parcialmente enovelados, conjuntos de proteínas nativas e agregados de polipeptídeos não nativos (MAYER, 2013). Esta alta versatilidade das HSP70 é devida à capacidade de reconhecimento de uma curta sequência polipeptídica (*motif*) que consiste em um núcleo de cinco resíduos de aminoácidos hidrofóbicos flanqueados por regiões de aminoácidos carregados positivamente (RÜDIGER et al., 1997). Tais sequências ocorrem em média a cada 30-40 resíduos em praticamente todas as proteínas, sendo que no estado nativo, são encontradas principalmente no núcleo hidrofóbico da proteína e são expostas apenas antes do enovelamento *de novo* ou após a desnaturação, o que explica a ligação das HSP70 às proteínas enoveladas, mas não às suas homólogas nativas (MAYER, 2013).

O ciclo de ligação e liberação do substrato é conduzido pela transição entre o estado ligado à molécula de ATP de baixa afinidade e o estado ligado à ADP de alta afinidade (MAYER; BUKAU, 2005). De fato, a hidrólise de ATP é essencial para a atividade de chaperona das HSP70 tanto *in vitro* como *in vivo* (BARTHEL et al., 2001). Os substratos encontram o complexo HSP70-ATP com altas taxas de associação, induzem hidrólise de ATP pelo domínio NBD e são então presos no HSP70-ADP, o qual apresenta baixas taxas de dissociação do peptídeo. Este mecanismo aumenta a afinidade aparente para polipeptídeos em várias ordens de magnitude e permite que as HSP70s evitem a agregação de forma eficiente (MAYER, 2013).

No entanto, as HSP70 não atuam isoladamente, mas com um conjunto de cochaperonas, sendo que as famílias mais importantes são as do domínio J (JDP) e as de fatores de troca de nucleotídeos (NEFs). Inicialmente, a JDP liga-se ao substrato, formando um complexo que interage com o domínio SBD da HSP70. Porém, esta interação só é permitida quando o domínio NBD da chaperona encontra-se ligado a uma molécula de ATP. Em seguida, a ligação do substrato em conjunto com a JDP estimula a hidrólise do ATP, o que promove uma alteração conformacional na parte helicoidal ao longo da fenda do sítio de ligação, com consequente enovelamento do substrato. A formação da ADP e a alteração conformacional, reduzem a afinidade de ligação com a cochaperona JDP, levando à sua dissociação do complexo. Posteriormente, o NEF liga-se à HSP70 auxiliando no processo de substituição da molécula de ADP por uma nova molécula de ATP. Após a ligação HSP70-ATP o substrato é liberado, e caso a conformação nativa da proteína não seja alcançada, a cochaperona JDP religa-se às regiões hidrofóbicas expostas dando início a um novo ciclo de enovelamento, até que a estrutura proteica esteja completamente recuperada (KAMPINGA; CRAIG, 2010).

Ademais, deve-se considerar também o mecanismo de indução da transcrição das HSP70, o qual envolve, entre outros elementos, os fatores de transcrição HSF (*Heat Shock Factor*). Tal fator é encontrado no núcleo e no citoplasma de células eucarióticas normais sob a forma de um monômero inativo e associado à HSPs. Em condições de estresse, ocorre acúmulo de proteínas dobradas anormalmente na célula, o que promove rapidamente a dissociação deste complexo HSF-HSP e a trimerização (e consequente ativação) dos HSF pela ação de quinases como PKC. Em seguida, estes trímeros acumulam-se no núcleo e ligam-se a uma sequência de nucleotídeos denominada HSE (*Heat Shock Element*), localizada dentro da região promotora dos genes que codificam as HSP, resultando em um elevado nível de transcrição dos genes codificadores de HSP, principalmente HSP70. Quando o estresse cessa,

os HSFs retornam ao estado inativo. Esta capacidade de regulação da expressão das HSP70 através de uma alça de feedback negativo garante, mais uma vez, que sejam consideradas eficientes biomarcadores (MORIMOTO, 1993; LUNZ; NATALI, 2005).

3. OBJETIVOS

Este estudo teve como finalidade verificar o potencial tóxico de uma amostra de vinhaça de cana-de-açúcar e uma de bio sólido por meio da imunomarcagem de proteínas de estresse celular da família HSP70 nas diferentes regiões do intestino médio do diplópodo *R. padbergi*, expostos a solos contendo tais resíduos em concentrações compatíveis com as normas brasileiras para a aplicação na agricultura.

Os objetivos específicos foram:

- ❖ Adaptar ao material de estudo deste trabalho, o protocolo existente para a imunohistoquímica de proteínas de choque térmico - Heat Shock Proteins – HSPs, desenvolvido para tecidos de abelha *Apis mellifera*.
- ❖ Analisar a imunomarcagem de proteínas de choque térmico, em particular das HSP70, indicativas de estresse celular, em cada uma das regiões do órgão em estudo e correlacioná-la aos processos fisiológicos associados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. *Rhinocricus padbergi*

Foram utilizados 30 indivíduos adultos da espécie *R. padbergi* como organismos-teste, com tamanho médio de 6 cm, a fim de evitar diferenças interespecíficas relacionados ao tamanho ou idade. Os espécimes foram coletados no campus da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro (22°24'36''S/47°33'36''W), São Paulo, Brasil. Após a coleta, estes foram aclimatados, por um período de 30 dias, em terrários contendo como substrato terra, batata e fragmentos de folhas e galhos de árvores oriundos do local de coleta. A temperatura foi mantida a $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante o experimento, e o fotoperíodo foi de 12 horas claro/12 horas escuro.

4.2. Solo controle

A amostra de solo utilizada como controle foi obtida do local de coleta dos diplópodos em uma profundidade de 0-20cm, no Campus da UNESP de Rio Claro. As amostras de solo foram homogeneizadas, secas à temperatura ambiente, peneiradas com malha de 4 mm e submetidas às análises químicas.

4.3. Vinhaça

O efluente foi coletado em uma usina de cana-de-açúcar no interior de São Paulo, Brasil (22°21'28"S/47°23'6"O). As amostras foram mantidas em câmara fria (4°C), até o início dos experimentos.

4.4. Biossólido

As amostras de biossólido foram coletadas em uma estação de tratamento de esgoto no interior do estado de São Paulo (20°32'30"S/47°25'11"O); 2 kg do material foram envolvidos em sacos plásticos, armazenados em caixas de isopor e acondicionadas em câmara fria (4°C), até sua utilização.

4.5. Caracterização química das amostras

As análises químicas e físico-químicas das amostras de solo controle e vinhaça foram realizadas pelo laboratório ASL Análises Ambientais (Rio Claro, São Paulo, Brasil). A caracterização da amostra de solo foi baseada em macro e micronutrientes (P, K, Ca, Mg, Al), matéria orgânica, pH, capacidade de troca catiônica (CTC), porcentagem de saturação de bases e por saturação por alumínio. A caracterização da amostra de vinhaça foi caracterizada com base no teor de elementos químicos traço (Al, Sb, As, Ba, B, Cd, Pb, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Hg, Mo, Ni, Ag, Se, V, Zn), e no potencial agronômico (carbono orgânico, condutividade elétrica, nitrogênio nitrato/nitrito, nitrogênio Kjeldahl, nitrogênio amoniacal, sódio total, potássio total, cálcio total, magnésio total, óxido de potássio, sólidos suspensos totais) além de DQO e DBO.

A caracterização da amostra de biossólido foi realizada pelo Laboratório TASQA (Paulínia, São Paulo, Brasil) baseada na concentração de metais (Ar, Ba, Cd, Pb, Cu, Cr, Mb, Ni, K total, Se, Na, Zn) e das 16 substâncias orgânicas prioritárias pela Environmental Protection Agency (EPA), além do potencial agronômico (carbono orgânico, condutividade elétrica, pH, nitrogênio nitrato/nitrito, nitrogênio Kjeldahl, nitrogênio amoniacal, sódio total, potássio total, cálcio total, magnésio total, sólidos totais).

4.6. Cálculos para a aplicação de vinhaça, segundo a norma P4.231, da CETESB

A dosagem máxima de vinhaça utilizada é determinada pela seguinte equação de acordo com a legislação P4.231 da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), agência do governo responsável pelo controle e fiscalização de atividades geradoras de poluição:

$$\text{m}^3 \text{ de vinhaça/ha} = [(0,05 \times \text{CTC} - \text{ks}) \times 3744 + 185] / \text{kvi}$$

Sendo:

0,05 = 5% da CTC do solo.

CTC = Capacidade de Troca Catiônica, expressa em cmolc/dm³.

ks = concentração de potássio no solo, expresso em cmolc/dm³, à profundidade de 0 a 0,80 metros.

3744 = constante para transformar os resultados da análise de fertilidade, expressos em cmolc/dm³ ou meq/100cm³, para kg de potássio em um volume de 1 (um) hectare por 0,80 metros de profundidade.

185 = massa, em kg, de K₂O extraído pela cultura por hectare, por corte.

kvi = concentração de potássio na vinhaça, expressa em kg de K₂O /m³.

4.6.1. Cálculos para a aplicação do lodo de esgoto, segundo a resolução CONAMA 375/2006

De acordo com a lei 375/2006 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), a aplicação máxima anual de lodo de esgoto e derivados, em toneladas por hectare, não poderá exceder o quociente entre a quantidade de nitrogênio recomendada para a cultura (em quilogramas/hectare), seguindo a recomendação oficial estado de São Paulo, e o teor de nitrogênio disponível (N_{avai}) no lodo de esgoto ou derivados (N_{avai} em quilogramas/tonelada), calculada como: N recomendado (quilogramas/hectare) / N disponível (quilogramas/tonelada).

Para determinar o teor de nitrogênio disponível (N_{avai}) no biossólido, as frações minerais (MF) foram calculadas. De acordo com o CONAMA, esta fração representa 40% de lodo de esgoto não digerido e 20% do lodo de esgoto digerido.

4.6.2. Preparação das amostras de solo e resíduos para montagem dos bioensaios com *R. padbergi*

Após as análises químicas das amostras, o volume de solo a ser disposto em cada terrário, assim como a sua densidade, Capacidade de Troca Catiônica (CTC) e teores de nitrogênio e potássio foram ser considerados para a montagem dos bioensaios. Para a aplicação da vinhaça, foi seguida a norma P4.231 da CETESB e para o biossólido, a resolução CONAMA 375/2006. O cultivo da cana-de-açúcar foi a cultura considerada no presente estudo.

Três terrários de 45 cm de comprimento, 25 cm de largura e 20 cm de altura, com capacidade para 22,5 L, foram preenchidos com 5 kg de solo controle em cada. Os dados obtidos a partir das análises físico-químicas das amostras de solo e resíduos foram inseridos nas equações apresentadas em ambas as leis para calcular o montante a ser aplicado.

Os seguintes bioensaios foram montados contendo o solo controle (CS), solo + vinhaça de cana-de-açúcar (SV), solo + biossólido (SB):

1. CS: 5 kg de solo controle
2. SV: 5 kg de solo controle + 668,25 ml de vinhaça de cana de açúcar
3. SB: 5 kg de solo controle + 250,63 g de biossólido

Dez indivíduos da espécie *R. padbergi* foram colocados em cada terrário, onde permaneceram por 30 dias. A temperatura também foi mantida a $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante o experimento, e o fotoperíodo foi de 12 horas claro/12 horas escuro.

4.7. Dissecção dos animais

Após o período de exposição de 30 dias, três animais de cada tratamento foram dissecados com auxílio de anestésico (éter sulfúrico) em solução fisiológica, para a remoção do intestino médio. Em seguida, porções do órgão foram fixadas em paraformaldeído 4% para a aplicação da técnica. Após a fixação de 24 horas, o material foi colocado em tampão fosfato de sódio (pH 7,4) e armazenado em câmara fria 4°C .

4.8. Imuno-histoquímica do intestino médio

O material fixado foi desidratado em série crescente de álcool gelado (15, 30, 50, 70, 85, 90, e 95%) durante 20 minutos cada banho. Em seguida, o material foi colocado em xilol + álcool por 20 minutos e em seguida xilol também por 20 minutos, sendo esta última etapa realizada duas vezes. Após este procedimento, foi feita a embebição do material em parafina líquida (Paraplast), sendo três trocas de 8 horas cada seguida pela inclusão. Posteriormente, o material foi seccionado em secções de $6\mu\text{m}$ com auxílio do micrótomo; as secções foram então hidratadas e recolhidas em lâminas.

Para a realização da imuno-histoquímica, foi seguido o protocolo adaptado proposto por Silva-Zacarin et al. (2012). Primeiramente, as lâminas foram desparafinizadas com soluções de xilol, xilol+álcool e álcool absoluto por 10 minutos cada e então gradualmente reidratadas em série crescente de álcool (95%, 80%, 70%, 50%) e água destilada. As secções foram em seguida permeabilizadas com Triton X-100 para garantir o livre acesso do anticorpo ao seu antígeno e lavadas com PBS. Para a imunomarcção da HSP70 foram utilizados o anticorpo primário (monoclonal anti heat shock protein 70 - HSP70 produzido em camundongo, Sigma) e o anticorpo secundário (anti mouse IgG molécula inteira, Sigma) conjugado com fosfatase alcalina, incubados em câmara úmida a 37°C , após etapa de bloqueio dos sítios inespecíficos para ligação com os respectivos anticorpos. Nas lâminas de controle da reação, o anticorpo primário não foi utilizado. Para a revelação da imunomarcção foi utilizado o kit EnVision (DakoTM) G|2 System/AP Rabbit/Mouse (Permanent Red).

4.10. Análises imuno-histoquímicas

Por meio do microscópio de luz todas as lâminas foram analisadas nas objetivas de 10x, 20x e 40x (aumento final de 100x, 200x e 400x, respectivamente); três campos selecionados aleatoriamente de cada secção histológica, totalizando 60 secções não consecutivas por grupo, foram capturados com objetiva de 40x (aumento de 400x), a partir de uma câmera acoplada ao microscópio, fazendo-se uso de programa próprio para captura de imagens – Leica Qwin Standard v. 2.8. Considera-se marcação positiva quando se observa uma cor vermelho-rosada representada pela deposição do cromógeno nos sítios de ligação antígeno-anticorpo, podendo ser de intensidade maior ou menor conforme a quantidade de proteínas da família HSP70 presente nas células e negativa quando não se observa qualquer marcação nesta coloração.

A imunomarcção destas proteínas foi avaliada de forma semi-quantitativa a partir destas imagens digitalizadas em função da região do órgão, de forma individual para cada secção histológica e de acordo com a seguinte escala: - = ausência de imunomarcção; + = imunomarcção fraca; ++ = imunomarcção moderada; +++ = imunomarcção intensa. Os resultados obtidos foram quantificados e calculou-se o percentual médio dos indivíduos através da proporcionalidade entre o número observado de cada intensidade de marcações e o número de campos avaliados (60 em média) para cada indivíduo. O resultado percentual de cada grupo de tratamento (CS, SV, SB) foi obtido através da média das porcentagens de cada indivíduo do grupo.

Para complementar esta análise, uma segunda análise semi-quantitativa foi realizada. As imagens digitalizadas também foram transferidas ao programa Image J v. 1.31 (disponível em <<http://rsbweb.nih.gov/ij/>>), que forneceu a porcentagem de área imunomarcada intensamente detectada por contraste em relação à área total de cada secção histológica analisada.

Os dados obtidos nas análises de cada tratamento (exposição à vinhaça e exposição ao bio sólido) foram comparados aos resultados obtidos para os indivíduos expostos à amostra de solo controle, por meio dos testes estatísticos ANOVA unidirecional e post-hoc de Tukey, com significância de 1%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados na forma de um artigo científico, o qual foi publicado na revista *Environmental Science and Pollution Research*.



RESEARCH ARTICLE

Toxicity evaluation of vinasse and biosolid samples in diplopod midgut: heat shock protein in situ localization

Maria Paula Mancini Coelho¹ · Cristina Moreira-de-Sousa¹ · Raphael Bastão de Souza¹ ·
 Yaira Ansoar-Rodríguez¹ · Elaine Cristina Mathias Silva-Zacarin² ·
 Carmem Silvia Fontanetti¹

Received: 8 March 2017 / Accepted: 10 July 2017
 © Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract Large amounts of residues generated by agricultural, urban and industrial activities are dumped daily on the soil. This practice deserves special attention because it causes serious environmental problems. This study evaluated the toxic potential of the sugarcane vinasse, a by-product of the sugar-alcohol industry, and the biosolid, a residue produced by wastewater treatment plants, both widely used as fertilizers. The evaluation was performed through bioassays using a typical soil bioindicator, the diplopod *Rhinocricus padbergi*. The specimens were exposed to soils containing these residues in concentrations that are compatible with the Brazilian regulation for agricultural use. Semi-quantitative immunolabelling analyses of the stress protein HSP70 were performed on the midgut of the studied diplopods. There was a significant increase in the immunolabelling of HSP70 proteins as a response to xenobiotics from both residues, particularly in regions where the function of the cells is the detoxification of the organ (e.g. the hepatic cell layer and specific regions of the epithelium). Higher immunolabelling was observed in the specimens exposed to vinasse in comparison with the biosolid exposure. This demonstrates that the substances in the tested residues had proteotoxic action in the exposed animals and induced a cytoprotective response,

which led to higher stress protein immunolabelling. Therefore, caution is needed for the use of such residues in agriculture.

Keywords Soil toxicity · Fertilizers · Millipedes · *R. padbergi* · Immunohistochemistry · HSP70

Introduction

One of the biggest concerns about environmental quality is the impact of large amounts of organic residues produced on a daily basis by agricultural, urban and industrial activities and deposited in aquatic and terrestrial ecosystems. The detection and quantification of the toxic substances contained in these residues is difficult and problematic due to their complex nature. Thus, in addition to the physicochemical analysis currently performed, complementary studies are necessary to distinguish between inert and contaminant components. In this sense, toxicity tests using bioindicators have been considered an important tool to evaluate the risks of these residues to both human health and the environment (Costa et al. 2008; Fontanetti et al. 2011).

The disposal of organic residues in terrestrial environments is practical and economically advantageous. However, this action may cause soil contamination. Despite their potentially pollutant characteristics, complex residues such as those produced by the sugar-alcohol industry and wastewater treatment plants are widely used as fertilizers due to their high level of organic matter.

Several studies (Canellas et al. 2003; Barros et al. 2010; Da Silva et al. 2014) have reported the advantages of using sugarcane vinasse, the main residue produced by the sugar-

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ Carmem Silvia Fontanetti
 fontanet@rc.unesp.br

¹ Department of Biology, Biosciences Institute, UNESP (São Paulo State University), Av. 24-A, 1515, Rio Claro, São Paulo 13506-900, Brazil

² Department of Biology, CCHB, UFSCar (Universidade Federal de São Carlos), Sorocaba, São Paulo, Brazil

alcohol industry, in agriculture. Vinasse has a high content of water and nutrients that are essential to plants, such as potassium, nitrogen and phosphorus, which ensures crop productivity, especially for sugarcane. On the one hand, this practice has been widely used in sugarcane-producing regions, replacing the use of chemical fertilizers to supply phosphorus to the crop (Christofolletti et al. 2013). On the other hand, several studies have demonstrated the toxicity of vinasse for aquatic organisms (Kumar and Gopal 2001; Marinho et al. 2014; Correia et al. 2017) and for plants such as *Allium cepa* (Pedro-Escher et al. 2016; Garcia et al. 2017) and *Tradescantia pallida* (Pedro-Escher et al. 2014). However, little is known about the impacts of this liquid residue on the edaphic fauna (Alves et al. 2015).

Likewise, sewage sludge, a residue produced by wastewater treatment plants, has also been a concern for the scientific community due to the increasingly large amounts generated by the urban centres. Therefore, new disposal alternatives have been investigated, and the use of this residue in agriculture as a soil conditioner is considered a sustainable alternative, avoiding contaminations due to improper stowage in the ocean, for example (Lara et al. 2007; Fytily and Zabaniotou 2008). Sludge may be rich in organic matter content, in addition to nutrients such as nitrogen and phosphorus, which improve the physical properties of the soil (e.g. density and particle aggregation) (Nascimento et al. 2004; Bovi et al. 2007; Fytily and Zabaniotou 2008; Alvarenga et al. 2015; Mondal et al. 2015). However, it may also contain metals, toxic and persistent organic compounds and disease vectors (Chenon et al. 2003; Santamaria and Toranzos 2003). The metals and organic compounds may induce different classes of genetic damage in plants of agronomic importance. Bioaccumulation of toxic compounds may occur in plant tissues and offer consumers a potential risk to their health. Some procedures can be used to form a biosolid that increases the solid content while decreasing the number of pathogenic microorganisms in the sewage sludge (Haynes et al. 2009). However, studies by Christofolletti et al. (2012, 2016) using the plant *A. cepa* and the millipede *Rhinocricus padbergi* as bioindicators showed the genotoxic and toxic potential of this residue, even after treatment.

Due to their close contact with the soil, diplopods have been widely used in toxicity evaluations as test organisms for several reasons (Fontanetti et al. 2011; Souza and Fontanetti 2011): they recycle and decompose organic matter and help to humidify the soil, and they are exposed to the contaminants of the environment. In addition, these animals colonize several layers of the soil and serve as route for the transference and biomagnification of the contaminants throughout the food chain. Finally, studies show their potential as bioindicator organisms and they are easy to use in

bioassays (Fontanetti et al. 2011; Christofolletti et al. 2013; Souza et al. 2014).

The success of the Brazilian millipede species *R. padbergi* in the evaluation of toxicity of complex substances was attested by several studies using different concentrations of vinasse (Christofolletti et al. 2016), sewage sludge (Nogarol and Fontanetti 2010; Godoy and Fontanetti 2010; Perez and Fontanetti 2011; Bozzatto and Fontanetti 2012), landfarming soil originated from oil refinery (Souza and Fontanetti 2011), and the herbicide trifluralin (Merlini et al. 2012). Thus, this organism proved to be an excellent bioindicator to evaluate soil quality (Souza and Fontanetti 2011; Souza et al. 2014).

The midgut is an excellent organ to evaluate the stressing action caused by the residues dumped on the soil. It plays an important role in the detoxification processes and excretion of xenobiotics, acting as a barrier to prevent toxic or non-essential compounds from reaching other parts of the organism (Godoy and Fontanetti 2010; Souza and Fontanetti 2011; Fontanetti et al. 2015). Additionally, the biological effects of the environmental contaminants can be measured in several levels of organization. The techniques that reveal responses at lower levels of biological organization are considered more preventive than other techniques, and can then be used to provide an early warning of environmental risk (Nascimento et al. 2008; Souza et al. 2014).

In this context, a tool that has been shown to be increasingly efficient in toxicity studies is the use of molecular markers such as heat shock proteins (HSPs) or cellular stress proteins (Mukhopadhyay et al. 2003; Danish et al. 2015; Rahul et al. 2015). These proteins are ubiquitously distributed and evolutionarily conserved among organisms, from bacteria to mammals. They have a cytoprotective role in the cell, responding to different stress-induced homeostatic disturbances (Liu et al. 2015).

Several studies have reported that HSP70 proteins function as metabolic detoxification activators induced by a variety of stress stimuli (pathological and environmental), such as toxic and carcinogenic chemical compounds, pesticides, metals and pathogens (Kiang and Tsokos 1998; Mukhopadhyay et al. 2003; Sreedhar and Csermely 2004; Mahmood et al. 2014; Liu et al. 2015). Thus, modulating the expression HSP70 in organisms exposed to proteotoxic agents has been considered a cellular stress marker and an efficient biomarker for risk assessment (Souza et al. 2014; Rahul et al. 2015).

The aim of the present study was to verify the toxicity of a vinasse and a biosolid sample using immunolabelling of the cell stress proteins HSP70 in each of the different cell layers of the midgut of the diplopod *R. padbergi* (epithelium, muscular layer and hepatic cell layer). Diplopods were exposed to soils containing such residues at concentrations that are compatible with the Brazilian regulations concerning agricultural application.

Material and methods

Rhinocricus padbergi

In this study, 30 individuals of *R. padbergi* were used as test organisms. In order to avoid interspecific differences concerning size or age, adults with an average size of 6 cm were used. The specimens were collected at UNESP, Rio Claro (22° 24' 36" S/47° 33' 36" W), Sao Paulo, Brazil. The specimens were then acclimated in terrariums for 30 days, with a substrate composed of earth, potato and fragments of leaves and branches from the place in which they were collected. The temperature was 21 ± 2 °C during the experiment, and the photoperiod was 12-h-light/12-h-dark.

Control soil

The control soil sample was obtained from the site where the diplopods were collected at a depth of 0–20 cm, at the campus of UNESP Rio Claro. The soil samples were homogenized, dried, sieved at 4 mm and submitted to chemical analysis.

Vinasse

The effluent was collected from a sugarcane mill in the countryside of Sao Paulo, Brazil (22° 21' 28" S/47° 23' 6" O). The samples were kept in a cold chamber (4 °C) until the start of the experiment.

Biosolid

Biosolid samples were collected from a wastewater treatment plant in the countryside of Sao Paulo State (20° 32' 30" S/47° 25' 11" O); 2 kg of the material was put in plastic bags, stored in Styrofoam boxes and kept in a cold chamber (4 °C).

Chemical characterization of the samples

The chemical and physicochemical analyses of the control soil and vinasse samples were performed by the laboratory ASL Environmental Analysis (Rio Claro, Sao Paulo, Brazil). The characterization of soil samples was based on macronutrients and micronutrients (P, K, Ca, Mg, Al), organic matter, pH, cation exchange capacity (CEC), percent base saturation and aluminium saturation. The characterization of vinasse samples was based on the content of trace elements (Al, Sb, As, Ba, B, Cd, Pb, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Hg, Mo, Ni, Ag, Se, V, Zn), on the agronomic potential (organic carbon, electrical conductivity, nitrate nitrite nitrogen, Kjeldahl nitrogen, ammoniacal nitrogen, total sodium, total potassium, total calcium, total magnesium, potassium oxide, total suspended solids) and on the COD (chemical oxygen demand) and BOD (biological oxygen demand) as well.

The characterization of the biosolid sample was performed by the Laboratory TASQA (Paulinia, Sao Paulo, Brazil) based on the metal concentration (As, Ba, Cd, Pb, Cu, Cr, Mb, Ni, total K, Se, Na, Zn) and on the 16 priority organic compounds (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) defined by the Environmental Protection Agency (EPA), in addition to the agronomic potential (organic carbon, electrical conductivity, pH, nitrate nitrite nitrogen, Kjeldahl nitrogen, ammoniacal nitrogen, total sodium, total potassium, total calcium, total magnesium and total solids).

Vinasse application calculation, in compliance with CETESB Technical Standard Norm P4.231

The maximum dosage of vinasse used was determined in accordance with the Technical Standard Norm P4.231 of the Environmental Sanitation Technology Company (CETESB, 2015), the governmental agency responsible for the control and fiscalization of polluting activities in the state of São Paulo, Brazil.

Sewage sludge application calculation, in compliance with CONAMA Law 375/2006

According to the Law 375/2006 of the National Environment Council (CONAMA), the maximum annual application of sewage sludge and derivatives, in tons per hectare, shall not exceed the quotient between the quantity of nitrogen recommended for the crop (in kg/ha), following the official recommendation for Sao Paulo State, and the nitrogen content available in the sewage sludge or derivatives (in kg/t), calculated as N recommended (kg/ha)/N available (kg/t).

Mineralization fractions were calculated to determine the nitrogen available in the sewage sludge and/or biosolid. According to CONAMA, this fraction represents 20% of digested sewage sludge (biosolid).

Preparation of soil and residue samples for the bioassays with *R. padbergi*

After the chemical analysis of the samples, the volume and density of the soil were established to prepare the bioassays. Regarding the biosolid sample, the application rate is given considering the content of nitrogen needed for the crop and the content of nitrogen present in the sewage sludge or derivatives. The crop considered in this study was sugarcane, whose recommended nitrogen content is 120 kg N/ha, according to Rajj and Cantarella (1997). However, the value considered in our experiment was 100 kg/ha, which is the nitrogen content usually used by Brazilian sugarcane mills.

Three terrariums with capacity for 22.5 L (L 45 cm, W 25 cm, H 20 cm) were filled with 5 kg of control soil each. The data obtained from the physicochemical analyses of the

soil and residue samples was inserted in equations established by the pertinent regulation to calculate the amount of residues to be applied.

The following bioassays were prepared containing the control soil (CS), soil + sugarcane vinasse (SV), soil + biosolid (SB):

1. CS: 5 kg of control soil
2. SV: 5 kg of control soil + 668.25 mL of sugarcane vinasse
3. SB: 5 kg of control soil + 250.63 g of biosolid

Ten diplopods of the species *R. padbergi* were placed in each terrarium for 30 days. The temperature was 21 ± 2 °C during the experiment, and the photoperiod was 12-h-light/12-h-dark.

Animal dissection

After a 30-day exposure period, three animals from each treatment group were anaesthetized with sulphur ether and dissected in physiological saline for removal of the midgut. Portions of the organ were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h. Then, the material was placed in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) and stored in cold chamber at 4 °C.

Immunohistochemistry of the midgut

The fixed material was dehydrated in increasing concentrations of cold ethanol (15, 30, 50, 70, 85, 90 and 95%) for 20 min in each bath. The material was then transferred to a xylol + ethanol mixture for 20 min and then to xylol, also for 20 min; the latter step was performed twice. Next, the material was embedded three times in liquid paraffin (Paraplast), remaining in paraffin for 8 h each time. After the inclusion, the material was sectioned at 6 µm thickness using a microtome. The sections were then hydrated and transferred to slides.

The immunohistochemistry was performed according to the adapted protocol proposed by Silva-Zacarin et al. (2012). The paraffin was removed from the slides with 10-min baths in solutions of xylene, xylene + alcohol and absolute alcohol. After deparaffinization, the slides were gradually hydrated in a series of alcohols (95, 80, 70, 50%) and distilled water. The sections were then permeabilized with Triton X-100 to ensure free access of the antibody to the antigen, and washed with PBS.

For HSP70 immunolabelling, anti-HSP70 (monoclonal antibody produced in mouse; Sigma, St. Louis, MO, USA; 1:100 dilution) was used with anti-mouse whole molecule IgG conjugated with alkaline phosphatase (Sigma, St. Louis, MO, USA; 1:100 dilution) as the secondary antibody. After the blockage step, slides were incubated in a humid chamber at 37 °C for binding of the respective antibodies. The Kit EnVision (Dako™) G|2 System/AP Rabbit/Mouse

(Permanent Red) was used to reveal the immunolabelling. To access the efficiency of the immunohistochemical detection of HSP70, slides without the primary antibody incubation were made and showed no immunolabelling.

Immunohistochemical analysis

All the slides were analysed under light microscope using $\times 10$, $\times 20$ and $\times 40$ objective lens (total magnification of $\times 100$, $\times 200$ and $\times 400$, respectively). Three randomly selected fields of each histological section, in a total of 60 non-consecutive sections per group, were captured with a camera (magnification of $\times 400$) attached to the microscope, using the Leica QWin Standard v. 2.8 program. Positive labelling was considered when a red-pink colour was observed, indicating the deposition of the chromogen in the antigen-antibody-binding sites. Intensity may vary according to the amount of HSP70 protein present in the cells. Absence of such coloration attested negative labelling.

Considering the portion of the organ, a semi-quantitative evaluation of protein immunolabelling in digitized images was performed according to the following the scale: – = no immunolabelling, + = weak immunolabelling, ++ = moderate immunolabelling and +++ = intense immunolabelling. The mean percentage of labelling per individual results was quantified, and the mean percentage of the individuals was calculated considering the proportionality between the number observed in each labelling intensity and the number of fields assessed in each individual (60 on average). The percentage result for each group (CS, SV, SB) was obtained using the mean percentage of each individual of the groups.

To complement this analysis, a secondary semi-quantitative analysis was done. The digitized images were transferred to the program ImageJ v. 1.31 (available as free-ware from <http://rsbweb.nih.gov/ij/>), which provided the percentage of intense immunolabelled area detected by contrast in relation to the total area analysed in each histological section. The data obtained through this semi-quantitative evaluation of each treatment (exposure to vinasse and biosolid) was compared with the results obtained for the individuals exposed to the control soil sample using parametric statistics tests one-way ANOVA and Tukey's post hoc test, $p < 0.001$.

Results

Chemical characterization of the samples

Table 1 shows data regarding agronomic potential and fertility of the control soil for the correct application of the residues according to the Brazilian legislation. The results obtained by the physicochemical analysis of vinasse and biosolid samples

Table 1 Data regarding the fertility of the control soil

Sample	pH (CaCl ₂)	OM (g/dm ³)	P (mg/dm ³)	K (mmol _c /dm ³)	Ca (mmol _c /dm ³)	Mg (mmol _c /dm ³)	H + Al (mmol _c /dm ³)	SB (mmol _c /dm ³)	CEC (mmol _c /dm ³)	V(%)
Soil	6	85	22	2.9	199	55	14	256.9	270.9	95

OM organic matter, CEC cation exchange capacity, SB sum of the bases, V base saturation

are presented in Tables 2, 3 and 4. Except for nickel, all the parameters for the sugarcane vinasse were in compliance with the Guiding Values for Underground Water CETESB-195/2005. Regarding the biosolid sample, all the parameters were in compliance with the CONAMA Law 375/2006, which regulates the disposal of sewage sludge and derivatives.

Immunohistochemistry

Immunolabels were analysed in each of the different cellular layers that constitute the midgut of millipedes: epithelium (apical and basal portions), muscular layer and hepatic cell layer (Fig. 1a). The control group showed evident but weak immunolabelling (+) in the basal portion of the epithelium and a mostly moderate (++) for the apical region of the epithelium and for the hepatic cell layer (Figs. 1b, 2, 3 and 4). In the muscular layer supporting the epithelium, there was no immunolabelling for HSP70 (Fig. 1b). Using ImageJ, the control group showed the lowest mean percentage of the intensely immunolabelled area (3.41%) in comparison to the exposed groups (Fig. 5).

The group exposed to vinasse showed 8.05% of intensely immunolabelled area, a statistically different ($p < 0.001$) result

in comparison with the control and the exposed to biosolid group (Fig. 5). Only the exposed groups showed strong immunolabelling for both apical and basal portions of the epithelium, where the regenerative cells are located. The hepatic cell layer also showed an increase in the area of intense immunolabelling (+++) in comparison with the other groups (Figs. 1c, 2, 3 and 4).

The group exposed to the biosolid showed an increase in the labelling of the apical and basal portions of the epithelium and in the hepatic cell layer when compared to the control group. This labelling was less intense in comparison with the group exposed to vinasse (Figs. 1d, 2, 3 and 4). According to the ANOVA ($p < 0.001$), there was no significant difference between the percentage of intensely labelled areas in this group (4.17%) and the control group (3.41%) (Fig. 5).

Discussion

The heat shock protein HSP70 is stored in distinct subcellular compartments, including the cytoplasm, mitochondria and endoplasmic reticulum (Boorstein et al. 1994; Mayer and Bukau

Table 2 Physicochemical analysis of vinasse and biosolid sample

Parameter	Samples		GVP (mg/kg)	MCA (mg/kg)	Method
	V (mg/L)	B (mg/kg)			
Total calcium	828 (dilution 25)	3197	—	—	EPA 6010 C
Total sulphur	—	1215	—	—	EPA 6010 C
Total phosphorus	—	11,039	—	—	EPA 6010 C
Total magnesium	321.250 (dilution 25)	1397	—	—	EPA 6010 C
Nitrite	<LQ	25.5	—	—	SM22 4500B
Ammoniacal nitrogen	10.920	4813	—	—	SM22 4500 E
Kjeldahl nitrogen	234.1	11,122	—	—	SM22 4500 B
pH	4.14	7.6	—	—	EPA 9045 C
Total potassium	3276 (dilution 100)	3221	—	—	EPA 6010 C
Total sodium	13.57	520	—	—	EPA 6010 C
Solid content (mg/L)	1190	185,162	—	—	SM22 2540 B
Moisture (g/g)	—	0.8148	—	—	SM22 2540 B

V sugarcane vinasse, B biosolid, QL quantification limit, GVP Guiding Values of Prevention and Intervention for Soil and Groundwater according to CETESB (195/2005-E), MCA maximum concentration allowed in sewage sludge and derivatives according to CONAMA (375/2006), SM22 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 22th Edition 2012, EPA Environmental Protection Agency, SSSA chapter 34 Soil Science Society of America, Methods of Soil Analysis—Part 3—Chemical methods

Table 3 Metal analysis of the vinasse and biosolid sample

Parameter	Samples		GVP (mg/kg)	MCA (mg/kg)	Method
	V (mg/L)	B (mg/kg)			
Arsenic	<LQ	<LQ	0.01	41	EPA 6010 C
Barium	0.218	174	0.7	1300	EPA 6010 C
Cadmium	<LQ	<LQ	0.005	39	EPA 6010 C
Lead	<LQ	26	0.01	300	EPA 6010 C
Copper	0.155	153	2	1500	EPA 6010 C
Chromium	<LQ	128	0.05	1000	EPA 6010 C
Mercury	<LQ	0.25	0.001	17	EPA 7470 A
Molybdenum	<LQ	6.17	0.07	50	EPA 6010 C
Nickel	0.029	40.9	0.02	420	EPA 6010 C
Selenium	<LQ	<LQ	0.01	100	EPA 6010 C
Zinc	0.625	312	5	2800	EPA 6010 C

V sugarcane vinasse, B biosolid, QL quantification limit, GVP Guiding Values of Prevention and Intervention for Soil and Groundwater according to CETESB (195/2005-E), MCA maximum concentration allowed in sewage sludge and derivatives according to CONAMA (375/2006), EPA Environmental Protection Agency, SSSA chapter 34 Soil Science Society of America, Methods of Soil Analysis—Part 3—Chemical methods

2005; Wang et al. 2013). These proteins have specific functions in the signalling pathways related to cell growth and in the prevention or reversal of proteotoxic damages caused by stress, including oxidative stress (Polla et al. 1996). Despite the nomenclature of these proteins, several other adverse factors can lead to an increase in HSP synthesis in addition to increased temperatures: chemical, physical and biological

inducers (metals, metabolism inhibitors, xenobiotics, chemotherapeutic agents, infections), including the cell division cycle and growth factors, common cell mechanisms (Erata et al. 2005).

All these characteristics combined with the occurrence of HSP70 in all eukaryotic organisms allow this protein to be considered as an excellent biomarker in the ecotoxicology field. It acts as a link between toxicant exposure and the ecologically relevant effects in a population or community level. A significant increase in the expression of HSP70 protein is evidence of environmental alterations, as it acts on the renaturation or removal of denatured proteins, which would be cytotoxic (Köhler et al. 1995; Nadeau et al. 2001; Malaspina and Silva-Zacarin 2006; Souza et al. 2014; Lüchmann et al. 2015).

Despite its potential as a biomarker of environmental pollution, studies that evaluate the expression of HSP70 in soil invertebrates, especially diplopods, are recent and scarce (Eckwert et al. 1994; Zanger et al. 1996). To our knowledge, the present work is pioneer in quantifying areas of the midgut where the labelling of HSP70 was more intense, which indicates a larger expression in these specific regions. This may be evidence of a cytoprotective process taking place in each region of the midgut.

Considering the information above and the results of this study, it is possible to elaborate some hypotheses about HSP70 protein labelling in the midgut of the *R. padbergi* diplopod, when comparing the control group and those groups exposed to vinasse and biosolid.

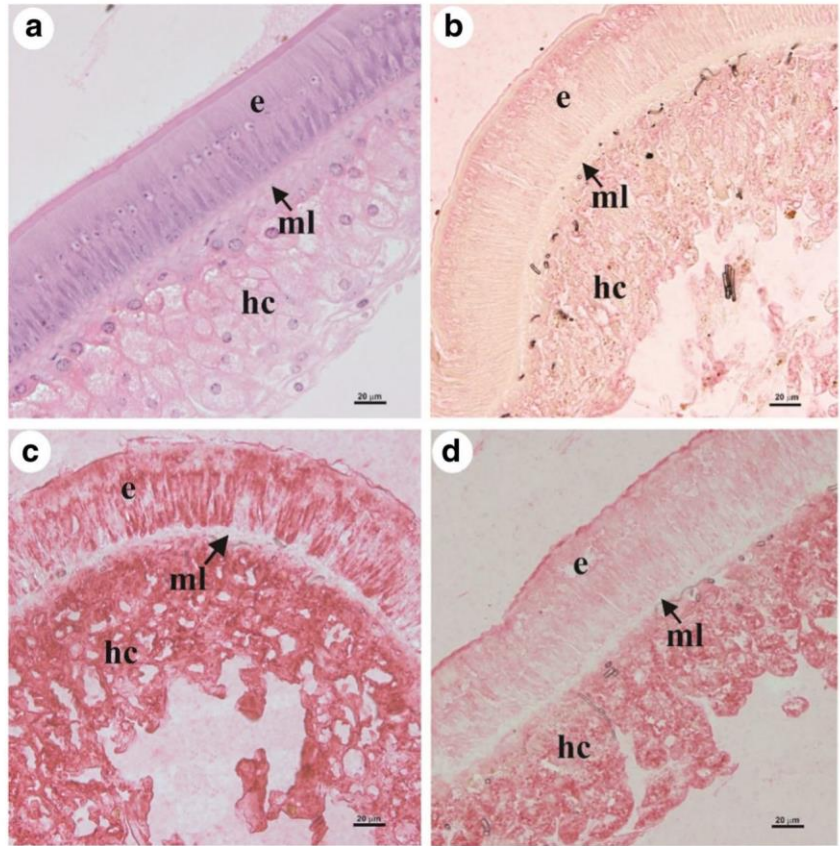
Animals in the control group showed weak immunolabelling. This demonstrates that HSP70 is commonly found in the analysed organ due to its function as cell chaperone. The observation of these labellings in more specific regions of the organ

Table 4 Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in raw samples of biosolid sample

Parameter	B (µg/kg)	Method	CO (mg/kg)
Acenaphthene	<LQ	EPA 8270 D	–
Acenaphthylene	<LQ	EPA 8270 D	–
Anthracene	<LQ	EPA 8270 D	–
Benzo(a)anthracene	<LQ	EPA 8270 D	0.025
Benzo(a)pyrene	<LQ	EPA 8270 D	0.052
Benzo(b)fluoranthene	<LQ	EPA 8270 D	0.38
Benzo(g,h,i)perylene	<LQ	EPA 8270 D	0.57
Benzo(k)fluoranthene	<LQ	EPA 8270 D	0.38
Chrysene	<LQ	EPA 8270 D	8.1
Dibenzo(a,h)anthracene	<LQ	EPA 8270 D	0.08
Phenanthrene	<LQ	EPA 8270 D	3.3
Fluoranthene	<LQ	EPA 8270 D	–
Fluorene	<LQ	EPA 8270 D	–
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	<LQ	EPA 8270 D	0.031
Naphthalene	<LQ	EPA 8270 D	0.12
Pyrene	<LQ	EPA 8270 D	–

B biosolid, LQ limits of quantification, EPA 8270 D method used to determine the concentration of semi-volatile organic compounds in extracts prepared from many types of solid waste matrices, CO maximum concentration allowed in the soil according to CONAMA (375/2006)

Fig. 1 Midgut histological sections of *R. padbergi* subjected to HE technique (a), HSP70 immunohistochemistry (b–d). a, b Control group. c Group exposed to vinasse. d Group exposed to biosolid. e epithelium; ml muscular layer; hc hepatic cells; bar = 20 μm



suggests that they are located preferentially in regions that participate in cytoprotective processes. One of these regions is the epithelial cells, which contribute by forming a kind of stable protective barrier for the organism against external agents. It also promotes cellular renovation, which confers protection to the organ by replacing damaged or malfunctioning cells.

The moderate immunolabelling observed in hepatic cells is explained by the role played by these cells in the organisms’ detoxification process. In fact, among the

several studies done with the midgut of *R. padbergi*, all had large accumulations of spherocrystals in the hepatic cells, showing its role in the inactivation of toxic chemical compounds (Fontanetti et al. 2015). In this sense, the labelling observed in the hepatic cells in this study, for both control and exposed animals, confirms that high levels of HSP70 are responsible for cytoprotection of the cells that are subject to the action of parental molecules and secondary metabolites during the

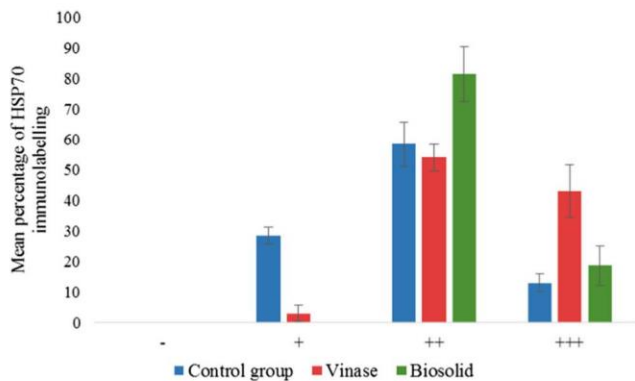


Fig. 2 Expression pattern of HSP70 in the apical portion of the midgut epithelium of *R. padbergi*. Bar diagram showing the relative intensity of HSP expression (means ± SD). Values expressed as percentage. – no immunolabelling; + weak immunolabelling; ++ moderate immunolabelling; +++ intense immunolabelling

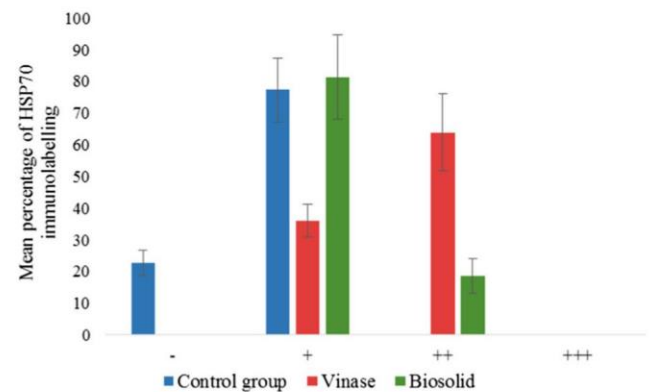


Fig. 3 Expression pattern of HSP70 in the basal portion of the midgut epithelium of *R. padbergi*. Bar diagram showing the relative intensity of HSP expression (means ± SD). Values expressed as percentage. – no immunolabelling; + weak immunolabelling; ++ moderate immunolabelling; +++ intense immunolabelling

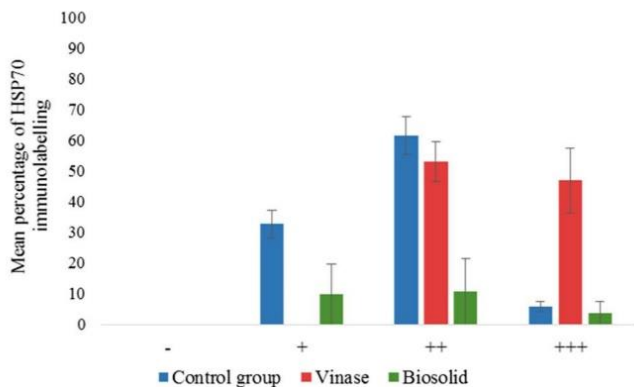


Fig. 4 Expression pattern of HSP70 in the hepatic cells of the midgut epithelium of *R. padbergi*. Bar diagram showing the relative intensity of HSP expression (means \pm SD). Values expressed as percentage. – no immunolabelling; + weak immunolabelling; ++ moderate immunolabelling; +++ intense immunolabelling

biotransformation of the compounds absorbed by the intestine (Sreedhar and Csermely 2004).

It is possible to draw a parallel between the analyses performed for the midgut using light (Fantazzini et al. 2002) and transmission electron microscopy (Camargo-Mathias et al. 2004), and the immunohistochemical results found in this study.

The epithelium of *R. padbergi* is pseudostratified and composed of absorptive (or principal) cells intercalated by regenerative and secretory cells (Fantazzini et al. 2002; Camargo-Mathias et al. 2004). The absorptive cells present a well-developed brush border, and are involved in the processes of food absorption and in the transportation of elements to the haemolymph as well. However, studies have reported that these cells accumulate metals, such as lead, cadmium, zinc, copper (Köhler et al. 1995) and calcium (Fantazzini et al. 2002). The presence of metals or toxic substances can induce an increase in the HSP70 expression (Erata et al. 2005) as the absorptive cells react to protect the organism from harmful

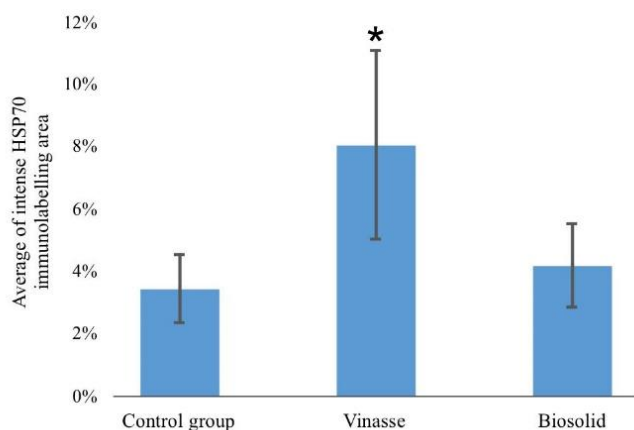


Fig. 5 Average of intense HSP70 immunolabelling area detected by contrast in relation to the total area analysed in the midgut of *R. padbergi* obtained using the ImageJ program (means \pm SD). Values expressed as percentage. * Statistically significant when compared to the other groups by one-way ANOVA/Tukey, $p < 0,01$

substances (Fontanetti et al. 2015). Considering this, it is suggested that the higher concentration of HSP70 protein in these cells is a response to the experimental situation that induced the cell stress in this study, mainly to the exposure to vinasse and, in lower intensity, to the biosolid.

The regenerative cells, located in the basal region of the epithelium along the midgut, are responsible for the epithelial renovation (Hopkin and Read 1992), besides playing the role of unipotent stem cells in diplopod midgut (Sosinka et al. 2014). Thus, the immunolabelling observed in the basal region of the midgut from the animals exposed to vinasse and to the biosolid corresponds to the region where the regenerative cells are located. This suggests that the HSP70 proteins present in these cells would have been expressed due to their activation for a possible cell renovation as a response to the stress caused by the substances present in the residues, such as metals, even in concentrations below those that are detectable by the analytical method applied.

The secretory cells, commonly observed in the midgut epithelium of several diplopods, are closely related to a cytoprotective function, as many studies have reported an increase in the number of these cells in diplopods exposed to contaminated soils (Perez and Fontanetti 2011; Nogarol and Fontanetti 2010; Merlini et al. 2012). The release of secretory vesicles is an indirect way of eliminating undesired substances from the organism (Fontanetti et al. 2015). Therefore, these cells probably participated in expression of the HSP70 proteins in the animals exposed to the substances used in this study, since the animals exposed to vinasse were significantly marked when compared to the control group.

From the ultrastructural point of view, the organelles present in the midgut cells of *R. padbergi* (Camargo-Mathias et al. 2004) suggest that the location of preferential regions for HSP70 protein expression is related to the position of the organelles in the cells. The presence of more intense labelling in the apical region of the epithelium could be associated with the presence of a large number of mitochondria in this site. As mitochondria occur where the energetic demand is higher, the labelling observed in the epithelium of the animals exposed to vinasse and biosolid could be associated with the sites containing a larger number of mitochondria. The HSP proteins play a fundamental role in stabilizing newly synthesized mitochondrial precursor proteins that are in the unwound form. This prevents their aggregation before the appropriated moment: the interaction with the external mitochondrial membrane translocase complex, which leads to their import and posterior winding in the interior of the organelle (Alberts et al. 2010; Gupta et al. 2010).

Overall, the differences observed between the immunolabelling intensities suggest that the exposure to vinasse triggered a heavier cytoprotective response of the organ in comparison with the biosolid. This can be due to the different potentially toxic elements (PTEs), such as trace elements (metals and metalloids), present in

both mixtures, as they induced distinct intensities of stress response.

Metals like copper (Cu), cobalt (Co) and Nickel (Ni) were detected in both samples, but only the last one in concentrations above the allowed limit for vinasse. They are capable of producing reactive radicals in cells, resulting in damage to DNA, lipid peroxidation and other effects (Valko et al. 2005). It is known that, in a molecular level, these proteins are key targets of these metallic ions, which can interfere in protein folding and consequently affect protein homeostasis and cell viability (Sharma et al. 2008, Tamás et al. 2014). Thus, induction of the HSP70 protein family can happen due to the interruption of protein homeostasis as a result of the primary and secondary effect of metals. This occurs not only due to the effect on individual proteins but also by promoting the formation of proteotoxic aggregates in a spectrum of cellular responses known as proteotoxicity (Hightower 1991; Köhler et al. 1996; Tamás et al. 2014).

In contrast, several studies have demonstrated that the amount of metals available and mobile in the soil is more predictive of the biological effects than their total concentrations (Natal-da-luz 2011), especially when it comes to terrestrial invertebrates like diplopods. Therefore, it is important to note that these metals would be strongly attached to the biosolid organic matter, limiting their potential bioavailability in the soil (Silveira et al. 2003). In fact, Kiikkila et al. (2002) showed that biosolid can act as an organic immobilizer agent, for example by reducing the concentration of exchangeable copper. This situation does not apply to vinasse as it is as an aqueous solution in fertirrigation, which may explain the difference in the results obtained between the residues.

Diplopods, by feeding from contaminated soil, may present bioaccumulation of metals in the midgut as insoluble granules (spherocrystals) in order to neutralize the toxic effects of these compounds (Köhler 2002; Christofolletti et al. 2016). Besides that, it is known that the cellular components usually affected by metals in the midgut of diplopods are designated as heat shock protein-binding sites (Köhler et al. 1992). Moreover, the induction of HSP70 may occur before the accumulation of metals inside the cells, since its expression can be modulated by cell signal transducers, promoting a protective response before such an effect (Urani et al. 2001).

However, as these residues are complex mixtures, it is not possible to establish a direct relation between their constituents and the damage caused. Their toxicity can also be the result of additive, antagonistic or synergic effects of the substances (Natal-da-luz et al. 2009; Alves et al., 2015).

Nevertheless, some studies have demonstrated that the HSP expression response in soil invertebrates, both in laboratory and field conditions, is especially suitable to indicate the exposure effects to relatively low concentrations of several toxic substances (Kammenga et al. 2000). This can reveal sublethal damage to the cells as a result of stress triggered

by environmental factors (Ryan and Hightower 1996; Mahmood et al. 2014). Nadeau et al. (2001) concluded that the induction of HSP70 could not be considered a biomarker just due to its broad spectrum of exposure but also by its effect, since known toxic agents alter the HSP70 gene expression tissues and organs of earthworms, another important group of the soil macrofauna.

Conclusion

The analyses performed in this study revealed that the exposure of the bioindicator *R. padbergi* to both organic residues used in sugarcane crops triggered interesting cell responses, which were observed in a different way in each region that comprise the animal midgut. The cytoprotective responses caused by the proteotoxic action of the residues in the midgut stimulated an increase in the expression of HSP70 stress protein family. Therefore, stronger immunolabelling for HSP70 was observed in response to vinasse when compared with the biosolid, particularly in cell regions that play a role in detoxification, such as the epithelial cells. Thus, caution is advised in the use of these residues in agriculture. In addition, these results demonstrate that the HSP70 immunolabelling technique in the test organism can be a satisfactory tool for investigation of toxic potential of environmental samples and for analysis of new substances disposed in the environment.

Acknowledgements The authors thank FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, process no. 2012/50197-2 and 2014/12646-5) for financial support, and Gerson Mello de Souza for his help in the laboratory.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2010) *Biologia Molecular da Célula*, quinta ed. Artmed, Porto Alegre (in Portuguese)
- Alvarenga P, Mourinha C, Farto M, Santos T, Palma P, Sengo J, Morais MC, Cunha-Queda C (2015) Sewage sludge, compost and other representative organic wastes as agricultural soil amendments: benefits versus limiting factors. *Waste Manag* 40:44–52
- Alves PRL, Natal-da-Luz T, Sousa JP, Cardoso EJBN (2015) Ecotoxicological characterisation of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. *Sci Total Environ* 526:222–232
- Barros RP, Viégas PRA, Silva TL, Souza RM, Barbosa L, Viégas RA, Barreto MCV, Melo AS (2010) Alterações em atributos químicos de solo cultivado com cana-de-açúcar e adição de vinhaça. *Pesq Agropec Trop* 40:341–346 (in Portuguese)
- Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA (1994) Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J Mol Evol* 38(1):1–17

- Bovi MLA, Godoy-Júnior G, Costa EAD, Berton RS, Spiering SH, Vega FVA, Cembranelli MAR, Maldonado CAB (2007) Lodo de esgoto e produção de palmito em pupunheira. R Bras Ci Solo 3:153–166 (in Portuguese)
- Bozzatto V, Fontanetti CS (2012) Sewage sludge toxicity in edaphic organism: analysis of midgut responses in the diplopod *Rhinocricus padbergi*. Microsc Res Tech 75(7):869–875
- Camargo-Mathias MI, Fantazzini ER, Fontanetti CS (2004) Ultrastructural features of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (diplopoda: spirobolida). Braz J Morphol Sci 21(2):65–71
- Canellas LP, Velloso ACX, Marciano CR, Ramalho JFGP, Rumjanek VM, Rezende CE, Santos GA (2003) Propriedades químicas de um Cambissolo cultivado com cana-de-açúcar, com preservação do palhão e adição de vinhaça por longo tempo. R Bras Ci Solo 27:935–944 (in Portuguese)
- CETESB-Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (2005). Norma 195/2005-E: Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo-2005, em substituição aos Valores Orientadores de 2001. 215 (in Portuguese) http://solo.cetesb.sp.gov.br/wpcontent/uploads/sites/34/2014/12/tabela_valores_2005.pdf Accessed 3 August 2015
- CETESB-Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (2015) Norma P4.231: Vinhaça: Critérios e Procedimentos para Aplicação no Solo Agrícola (in Portuguese) http://www.cetesb.sp.gov.br/Tecnologia/camaras/P4_231.pdf Accessed 3 August 2015
- Chenon P, Gauthier L, Loubières P, Séverac A, Delpoux M (2003) Evaluation of the genotoxic and teratogenic potential of a municipal sludge and sludge-amended soil using the amphibian *Xenopus laevis* and the tobacco: *Nicotiana tabacum* L var *xanthi*. DulleuSci Total Environ 301:139–150
- Christofoletti CA, Francisco A, Fontanetti CS (2012) Biosolid soil application: toxicity tests under laboratory conditions. Appl Environ Soil Sci 2012:1–9
- Christofoletti CA, Pedro-Escher J, Correia JA, Marinho JFU, Fontanetti CS (2013) Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. Waste Manag 33:2752–2761
- Christofoletti CA, Francisco A, Pedro-Escher J, Gastaldi VD, Fontanetti CS (2016) Diplopods as soil bioindicators of toxicity after application of residues from sewage treatment plants and ethanol industry. Microsc Microanal 22:1098–1110
- CONAMA-Conselho Nacional do Meio Ambiente (2006) Resolução 375/2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências (in Portuguese) <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>. Accessed 3 August 2015
- Correia JE, Christofoletti CA, Marcato ACC, Marinho JFU, Fontanetti CS (2017) Histopathological analysis of tilapia gills (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) exposed to sugarcane vinasse. Ecotox Environ Saf 135:319–326
- Costa CR, Olivi P, Botta CM, Espindola EL (2008) A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Quim Nova 31(7):1820–1830 (in Portuguese)
- Da Silva APM, Bono JAM, Pereira FAR (2014) Aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar: Efeito no solo e na produtividade de colmos. Rev Bras Eng Agríc Ambient 18(1):38–43 (in Portuguese)
- Danish M, Fatima A, Khanam S, Jyoti S, Ali F, Naz F, Siddique YH (2015) Evaluation of the toxic potential of calcium carbide in the third instar larvae of transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg9. Chemosphere 139:469–478
- Eckwert H, Zanger M, Reiss S, Musolff H, Alberti G, Köhler HR (1994) The effect of heavy metals on the expression of hsp 70 in soil invertebrates. Verh Dtsch Zool Ges 87(1):325
- Erata GO, Kanbagli O, Durlanik O, Bulut T, Tokar G, Uysal M (2005) Induced oxidative stress and decreased expression of inducible heat shock protein (hsp70) in patient with colorectal adenocarcinomas. Jpn J Clin Oncol 35(2):74–78
- Fantazzini ER, Fontanetti CS, Camargo-Mathias MI (2002) Midgut of the millipede “*Rhinocricus padbergi*” Verhoeff, 1938 (Diplopoda: Spirobolida): histology and histochemistry. Arthropoda Sel 11: 135–142
- Fontanetti CS, Nogarol LR, Souza RB, Perez DG, Maziviero GT (2011) Bioindicators and biomarkers in the assessment of soil toxicity. In: Pascucci S (ed) Soil Contamination, 1st edn. InTech, Rijeka, pp 143–168
- Fontanetti CS, Moreira-De-Sousa CM, Pinheiro TG, Souza RB, Francisco A (2015) Diplopoda-digestive system. In: Minelli A (ed) Treatise on zoology-anatomy, taxonomy, biology, 2nd edn. Leiden-Boston, Brill, pp 109–128
- Fytli D, Zabanitou A (2008) Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods – a review. Renew Sust Energ Rev 12:116–140
- Garcia CFH, Souza RB, de Souza CP, Christofoletti CA, Fontanetti CS (2017) Toxicity of two effluents from agricultural activity: comparing the genotoxicity of sugar cane and orange vinasse. Ecotox Environ Saf 142:216–221
- Godoy JAP, Fontanetti CS (2010) Diplopods as bioindicators of soils: analysis of midgut of individuals maintained in substrate containing sewage sludge. Water Air Soil Pollut 210:389–398
- Gupta SC, Sharma A, Mishra M, Mishra RK, Chowdhuri DK (2010) Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? Life Sci J 86(11–12):377–384
- Haynes RJ, Murtaza G, Naidu R (2009) Inorganic and organic constituents and contaminants of biosolids. Adv Agron 104:165–267
- Hightower LE (1991) Heat shock, stress proteins, chaperons, and proteotoxicity (meeting review). Cell 66:191–197
- Hopkin SP, Read HJ (1992) The biology of millipedes. Oxf Univ Press, Oxford
- Kammenga JE, Dallinger R, Donker MH, Köhler HR, Simonsen V, Triebkorn R, Weeks JM (2000) Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. Rev Environ Contam Toxicol 164:93–147
- Kiang JG, Tsokos GC (1998) Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. Pharmacol Ther 80:183–201
- Kiikkila O, Pennanen T, Perkiomaki J, Derome J, Fritze H (2002) Organic material as a copper immobilising agent: a microcosm study on remediation. Basic Appl Ecol 3:245–253
- Köhler HR (2002) Localization of metals in cells of saprophagous soil arthropods (Isopoda, Diplopoda, Collembola) Microsc Res Techniq 56:393–401
- Köhler HR, Triebkorn R, Stöcker W, Kloetzel PM, Alberti G (1992) The 70 kD heat shock protein (hsp70) in soil invertebrates: a possible tool for monitoring environmental toxicants. Arch Environ Con Tox 22(3):334–338
- Köhler HR, Körtje KH, Alberti G (1995) Content absorption quantities and intracellular storage sites of heavy metals in Diplopoda (Arthropoda). Biometals 8:37–46
- Köhler HR, Rahman B, Gräff S, Berkus M, Triebkorn R (1996) Expression of the stress-70 protein family (hsp70) due to heavy metal contamination in the slug, *Deroceras reticulatum*: an approach to monitor sublethal stress conditions. Chemosphere 33(7):1327–1340
- Kumar S, Gopal K (2001) Impact of distillery effluent on physiological consequences in the freshwater teleost *Channa punctatus*. Bull Environ Contam Toxicol 66:617–622
- Lara AI, Andreoli CV, Pegorini ES (2007) Environmental impact assessment and monitoring of final sludge disposal. In: Andreoli CV, Von Sperling M, Fernandes F (eds) Sludge Treatment and Disposal. Iwa Publishing, London, pp 226–236
- Liu T, Pan L, Cai Y, Miao J (2015) Molecular cloning and sequence analysis of heat shock proteins 70 (HSP70) and 90 (HSP90) and

- their expression analysis when exposed to benzo(a)pyrene in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Gene* 555(2):108–118
- Lüchmann KH, Clark MS, Bairy AC, Gilbert JA, Craft JA, Chipman JK, Thorne MAS, Mattos JJ, Siebert MN, Schroeder DC (2015) Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress responses revealed by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana*. *Aquat Toxicol* 166:10–20
- Mahmood K, Jadoon S, Mahmood Q, Irshad M, Hussain J (2014) Synergistic effects of toxic elements on heat shock proteins. *Biomed Res Int* 2014:1–17
- Malaspina O, Silva-Zacarin ECM (2006) Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. *Braz J Morphol Sci* 23(3/4):303–309
- Marinho JFU, Correia JE, Marcato ACC, Pedro-Escher J, Fontanetti CS (2014) Sugar cane vinasse in water bodies: impact assessed by liver histopathology in tilapia. *Ecotox Environ Saf* 110:239–245
- Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62(6):670–684
- Merlini VV, Nogarol LR, Marin-Morales MA, Fontanetti CS (2012) Toxicity of trifluralin herbicide in a representative of the edaphic fauna: histopathology of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). *Microsc Res Tech* 75:1361–1369
- Mondal S, Singhb RD, Patra AK, Dwivedi BS (2015) Changes in soil quality in response to short-term application of municipal sewage sludge in a typical haplustepl under cowpea-wheat cropping system. *Environ Nanotechnol Monit Manag* 4:37–41
- Mukhopadhyay I, Nazir A, Saxena DK, Chowdhuri DK (2003) Heat shock response: hsp 70 in environmental monitoring. *J Biochem Mol Toxicol* 17(5):249–254
- Nadeau D, Plante I, Morrow G, Tanguay RM (2001) Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cell Stress Chaperon* 6:153–163
- Nascimento CWA, Barros DAS, Melo EEC, Oliveira AB (2004) Alterações químicas em solos e crescimento de milho e feijoeiro após aplicação de lodo de esgoto. *R Bras Ci Solo* 28:385–392 (in Portuguese)
- Nascimento IA, Pereira SA, Leite MBNL (2008) Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: Zagatto PA, Betoletti E (eds) *Ecotoxicologia: Princípios e Aplicações*. RiMa, São Carlos, pp 413–432 (in Portuguese)
- Natal-da-luz T, Tidona S, Van Gestel CAM, Morais PV, Sousa JP (2009) The use of collembola avoidance tests to characterize sewage sludges as soil amendments. *Chemosphere* 77(11):1526–1533
- Natal-da-Luz T, Ojeda G, Costa M, Pratas J, Lanno RP, Van Gestel CAM, Sousa JP (2011) Shortterm changes of metal availability in soil. II: the influence of earthworm activity. *Appl Soil Ecol* 49:178–186
- Nogarol LR, Fontanetti CS (2010) Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: Tissue responses of the midgut. *Micron* 41:239–246
- Pedro-Escher J, Maziviero GT, Fontanetti CS (2014) Mutagenic action of sugarcane vinasse in the *Tradescantia pallida* test system. *J Ecosyst Ecograph* 4:145. doi:10.4172/2157-7625.10001
- Pedro-Escher J, Christofoletti CA, Ansoar-Rodríguez Y, Fontanetti CS (2016) Sugarcane vinasse, a residue of ethanol industry: toxic, cytotoxic and genotoxic potential using the *Allium cepa* test. *J Environ Prot* 7:602–612
- Perez DG, Fontanetti CS (2011) Assessment of the toxic potential of sewage sludge in the midgut of the diplopod *Rhinocricus padbergi*. *Water Air Soil Poll (Print)* 128:437–444
- Polla BS, Kantengwa S, Francois D, Salvioli S, Franceschi C, Marsac C, Cossarizza A (1996) Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6458–6463
- Rahul JS, Naz F, Siddique YH (2015) Evaluation of the toxic potential of cefotaxime in the third instar larvae of transgenic *Drosophila melanogaster*. *Chem Biol Interact* 233:71–80
- Raij BV, Cantarella HM (1997) In: Raij B, Van Cantarella H, Quaggio JA, AMC F (eds) *Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo*, 2nd edn. Rev Atual. Instituto Agrônomo, Campinas, pp 56–59 (in Portuguese)
- Ryan JA, Hightower LE (1996) Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology. *Stress-Inducible Cell Responses* 77:411–424
- Santamaria J, Toranzos GA (2003) Enteric pathogens and soil: a short review. *Int Microbiol* 6:5–9
- Sharma SK, Goloubinoff P, Christen P (2008) Heavy metal ions are potent inhibitors of protein folding. *Biochem Biophys Res Commun* 372(2):341–345
- Silva-Zacarin ECM, Chauzat MP, Zeggane S, Drajnudel P, Schurr F, Faucon JP, Malaspina O, Engler JA (2012) Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. *Curr Microsc Contrib Adv Sci Technol* 1:696–703
- Silveira MLA, Alleoni LRF, Guilherme LRG (2003) Biosolids and heavy metals in soils. *Sci Agric* 60(4):793–806
- Sosinka A, Rost-Roszkowska MM, Vilimova J, Tajovský K, Kszuk-Jendrysik M, Chajec L, Sonakowska L, Kaminska K, Hyra M, Poprawa I (2014) The ultrastructure of the midgut epithelium in millipedes (Myriapoda, Diplopoda). *Arthropod Struct Dev* 43:477–492
- Souza TS, Fontanetti CS (2011) Morphological biomarkers in the *Rhinocricus padbergi* midgut exposed to contaminated soil. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:10–18
- Souza TS, Christofoletti CA, Bozzatto V, Fontanetti CS (2014) The use of diplopods in soil ecotoxicology—a review. *Ecotoxicol Environ Saf* 103:68–73
- Sreedhar AS, Csermely P (2004) Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumour therapy. *Pharmacol Ther* 101:227–257
- Tamás MJ, Sharma SK, Ibstedt S, Jacobson T, Christen P (2014) Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomol Ther* 4(1):252–267
- Urani C, Melchiorretto P, Morazzoni F, Canevali C, Camatini M (2001) Copper and zinc uptake and HSP70 expression in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* 15(4–5):497–502
- Valko MMHCM, Morris H, Cronin MTD (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12(10):1161–1208
- Wang L, Yang C, Song L (2013) The molluscan HSP70s and their expression in hemocytes. *I S J* 10:77–83
- Zanger M, Alberti G, Kuhn M, Köhler HR (1996) The stress-70 protein family in diplopods: induction and characterization. *J Comp Physiol B* 165:622–627

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, pode-se concluir que:

- A caracterização química das amostras foi importante para uma melhor compreensão dos efeitos das amostras sobre o organismo-teste.
- As concentrações dos diferentes metais presentes nas amostras, mesmo sendo encontradas abaixo do permitido pelo CONAMA 357/2006, para aplicação de lodo de esgoto e biossólido em solos agrícolas e, pela P2.341 da CETESB, para o uso da vinhaça, podem ter sido as responsáveis pela resposta citoprotetora induzida no organismo-teste.
- O protocolo de processamento e aplicação da técnica imuno-histoquímica de marcação de proteínas de choque térmico foi estabelecido de forma eficiente para a aplicação no intestino médio de diplópodos da espécie *R. padbergi*.
- A modulação da expressão da família de proteínas HSP70 mostrou-se eficiente para avaliar a ação de amostras ambientais complexas, ocorrendo de forma distinta em cada camada celular que compõe o intestino médio do organismo-teste. Assim, a expressão destas proteínas em diplópodos pode ser uma ferramenta satisfatória na investigação do potencial tóxico de amostras ambientais, bem como no teste de novas substâncias lançadas no ambiente.
- A aplicação da vinhaça de cana-de-açúcar e do biossólido na agricultura, como fertilizantes, pode caracterizar um sério risco ao ambiente, pois os bioensaios com estas amostras brutas induziram ação proteotóxica em um órgão de vital importância de um bioindicador de solo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-MUTAIRI, N., BUFARSAN, A., AL-RUKAIBI, F. Ecorisk evaluation and treatability potential of soils contaminated with petroleum hydrocarbon-based fuels. **Chemosphere**, v.74, n.1, p.142-148, 2008.
- ALEXANDER, M. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. **Environmental Science and Technology**, v. 29, p. 2713-2717, 2000.
- ALVES, P. R. L.; NATAL-DA-LUZ, T.; SOUSA, J. P.; CARDOSO, E. J. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. **Science of the Total Environment**, v. 526, p. 222-232, 2015.
- ARIAS-ESTÉVEZ, M.; LÓPEZ-PERIAGO, E.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; SIMAL-GÁNDARA, J.; MEJUTO, J. C.; GARCÍA-RÍO, L. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 123, n. 4, p.247-260, 2008.
- BARRIOS, E. Soil biota, ecosystem services and land productivity. **Ecological economics**, v. 64, n. 2, p. 269-285, 2007.
- BARROS, R. P.; ALMEIDA VIÉGAS, P. R., LIMA DA SILVA, T.; MATOS DE SOUZA, R.; BARBOSA, L.; ALMEIDA VIÉGAS, R.; BARRETTO, M. C. V.; MELO, A. S. Alterações em atributos químicos de solo cultivado com cana-de-açúcar e adição de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 3, p. 341-346, 2010.
- BARTHEL, T. K.; ZHANG, J.; WALKER, G. C. ATPase-Defective Derivatives of *Escherichia coli* DnaK That Behave Differently with Respect to ATP-Induced Conformational Change and Peptide Release. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 19, p. 5482-5490, 2001.
- BETTIOL, W.; CAMARGO, O. D.; GALVÃO; J. A. H. GHINI; R. Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto: Descrição do estudo. **Lodo de esgoto: impactos ambientais na agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 17-24, 2006.
- BHARGAV, D.; SINGH, M. P.; MURTHY, R. C.; MATHUR, N.; MISRA, D.; SAXENA, D. K.; CHOWDHURI, D. K. Toxic potential of municipal solid waste leachates in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ): hsp70 as a marker of cellular damage. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 69, n. 2, p. 233-245, 2008.
- BOORSTEIN, W. R.; ZIEGELHOFFER, T.; CRAIG, E. A. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. **Journal of molecular evolution**, v. 38, n. 1, p.1-17, 1994.
- BOXALL, A. B.; SINCLAIR, C. J.; FENNER, K; KOLPIN, D.; MAUND, S. J. Peer reviewed: When synthetic chemicals degrade in the environment. **Environmental Science & Technology**, American Chemical Society, v. 10, p. 368-375, 2004.
- BOZZATTO, V.; FONTANETTI, C.S. Sewage sludge toxicity in edaphic organism: Analysis of midgut responses in the diplopod *Rhinocricus padbergi*. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 869-875, 2012.

BRAYNER, F. M. M. **Determinação de taxas de retenção de metais-traço por sedimentos orgânicos em um viveiro de piscicultura em área estuarina e urbana.** 1998. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Escola de engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

BRIGHT, D. A.; HEALEY, N. Contaminant risks from biosolids land application: contemporary organic contaminant levels in digested sewage sludge from five treatment plants in Greater Vancouver, British Columbia. **Environmental Pollution**, v. 126, n. 1, p.39-49, 2003.

BRISOLARA, K. F.; OCHOA, H. Biosolids and Sludge Management. **Water Environment Research**, v. 88, n. 10, p. 1230-1248, 2016.

BURGER, J. Bioindicators: types, development, and use in ecological assessment and research. **Environmental Bioindicators**, v. 1, p. 22-39, 2006.

CAI, Q. Y.; MO, C. H.; WU, Q. T.; ZENG, Q. Y.; KATSOYIANNIS, A. Occurrence of organic contaminants in sewage sludges from eleven wastewater treatment plants, China. **Chemosphere**, v. 68, n. 9, p. 1751-1762, 2007.

CAMARGO, O. A.; DENARDIN, J. E. 2013. **O solo no controle de qualidade do meio ambiente.** Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/culturas/milho/artigo/artigo--o-solono-controle-de-qualidade-do-ambiente_168659.html> Acesso em: 05 mar. 2017.

CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FANTAZZINI, E. R.; FONTANETTI, C. S. Ultrastructural features of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda: Spirobolida). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 21, n. 3, p. 65-71, 2004.

CANELLAS, L. P.; VELLOSO, A. C. X.; MARCIANO, C. R.; RAMALHO, J. F. G. P.; RUMJANEK, V. M.; REZENDE, C. E.; SANTOS, G. D. A. Propriedades químicas de um Cambissolo cultivado com cana-de-açúcar, com preservação do palhico e adição de vinhaça por longo tempo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 5, p. 935-944, 2003.

CASTRO, S. V.; LOBO, C. H.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Proteínas de choque térmico hsp 70: Estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 4, p. 261-271, 2013.

CESAR, R.; ALVARO, T.; SILVA, M.; COLONESE, J.; PEREIRA, C.; POLIVANOV, H.; ENGLER S.; BIDONE E.; CASTILHOS, Z. Biodisponibilidade de contaminantes em solos brasileiros tratados com lodo de esgoto: uma abordagem ecotoxicológica utilizando bioensaios com organismos aquáticos e edáficos. **Geochimica Brasiliensis**, v. 24, n. 1, p. 41-49, 2010.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (2015) **Norma P4.231: Vinhaça - Critérios e Procedimentos para Aplicação no Solo Agrícola.** Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Tecnologia/camaras/P4_231.pdf>. Acesso em: 3 ago 2015

CHRISTOFOLETTI, C. A.; FRANCISCO, A.; FONTANETTI, C. S. Biosolid soil application: toxicity tests under laboratory conditions. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; FRANCISCO, A.; PEDRO-ESCHER, J.; GASTALDI, V. D.; FONTANETTI, C. S. Diplopods as soil bioindicators of toxicity after application of residues from sewage treatment plants and ethanol industry. **Microscopy and Microanalysis**, v. 22, n. 5, p. 1098-1110, 2016.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J.; CORREIA, J. A.; MARINHO, J. F. U.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management** (Elmsford), v. 33, p. 2752-2761, 2013a.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C. S. Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, n.1523, p. 1-14, 2013b.

CINCINELLI, A.; MARTELLINI, T.; MISURI, L.; LANCIOTTI, E.; SWEETMAN, A., LASCHI, S.; PALCHETTI, I. PBDEs in Italian sewage sludge and environmental risk of using sewage sludge for land application. **Environmental Pollution**, v. 161, p. 229-234, 2012.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. 2017. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. v. 3, n.4, p.1-77. Disponível em: <https://www.novacana.com/pdf/18042017090454_Conab_-_4_Levantamento_2016-17_180417.pdf>. Acesso em: 10 maio 2017.

CORAZZA, R. I. **Reflexões sobre o papel das políticas ambientais e de ciência e tecnologia na modelagem de opções produtivas mais limpas numa perspectiva evolucionista: um estudo sobre o problema da disposição da vinhaça**. In: III Encontro Nacional da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica, 1999, Recife, 1999. 18p.

CORREIA, M. E. F.; DE AQUINO, A. M. Os diplópodes e suas associações com microrganismos na ciclagem de nutrientes. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia – Documentos 199**, 2005. 41p.

CORREIA, J. E.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y.; GUEDES, T. A., FONTANETTI, C. S. Comet assay and micronucleus tests on *Oreochromis niloticus* (Perciforme: Cichlidae) exposed to raw sugarcane vinasse and to physicochemical treated vinasse by pH adjustment with lime (CaO). **Chemosphere**, v. 173, p. 494-501, 2017a.

CORREIA, J. E.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; MARCATO, A. C. C.; MARINHO, J. F. U.; FONTANETTI, C. S. Histopathological analysis of tilapia gills (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) exposed to sugarcane vinasse. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 135, p. 319-326, 2017b.

CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. **Revista brasileira de energia**, v. 2, n. 2, p. 111-146, 1992.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M.; ESPINDOLA, E. L. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

DA SILVA, A. P.; BONO, J. A.; PEREIRA, F. D. A. Aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar: Efeito no solo e na produtividade de colmos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 38-43, 2014.

- DANGERFIELD, J. M.; TELFORD, S. R. Seasonal activity patterns in julid millipeds in Zimbabwe. **Journal of Tropical Ecology**, New York, v. 7, p. 281-285, 1991.
- DANISH, M.; FATIMA, A.; KHANAM, S.; JYOTI, S.; ALI, F.; NAZ, F.; SIDDIQUE, Y. H. Evaluation of the toxic potential of calcium carbide in the third instar larvae of transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg9. **Chemosphere**, v. 139, p. 469-478, 2015.
- DE JONGE, R. J.; BREURE, A. M.; VAN ANDEL, J. G. Reversibility of adsorption of aromatic compounds onto powdered activated carbon (PAC). **Water research**, v. 30, n. 4, p. 883-892, 1996
- DOUGLAS, P. M.; CYR, D. M. Interplay between protein homeostasis networks in protein aggregation and proteotoxicity. **Biopolymers**, v.93, n.3, p.229-236, 2009.
- ECKWERT, H.; ZANGER, M.; REISS, S.; MUSOLFF, H.; ALBERTI, G.; KÖHLER, H.-R. The effect of heavy metals on the expression of hsp 70 in soil invertebrates. **Verhandlungen der deutschen Zoologischen Gesellschaft**, v.87, n.1, p.325, 1994.
- ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management & Research**, v. 29, n. 12, p. 1235-1250, 2011.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Revised World Soil Charter**. Roma, Itália, 2015a. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/GSP/docs/ITPS_Pillars/annexVII_WSC.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2017.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **After the International Year of Soils, we won't take soils for granted anymore**. 2015b. Disponível em: <<http://www.fao.org/soils-2015/news/news-detail/en/c/353737/>>. Acesso em: 05 mar. 2017.
- FEDER, M. E., HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual review of physiology**, v. 61, n. 1, p. 243-282, 1999.
- FONTANETTI, C. S.; BUENO, O. C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. Bauru - SP: Canal 6, 2017. 275 p.
- FONTANETTI, C. S.; MOREIRA-DE-SOUSA, C.; PINHEIRO, T. G.; SOUZA, R. B.; FRANCISCO, A. Diplopoda-digestive system. In: MINELLI, A. (Ed.) **The Myriapoda**. v. 2 Boston: Brill, 2015. p. 109-127.
- FONTANETTI, C. S.; NOGAROL, L. R.; SOUZA, R. B.; PEREZ, D. G.; MAZIVIERO, G. Bioindicators and Biomarkers in the Assessment of Soil Toxicity. In: PASCUCCI, S. (Org.) **Soil Contamination**. Rijeka, Croácia: InTech, 2011. p. 143-168.
- FRANCISCO, A.; FONTANETTI, C. S. Diplopods and Agrochemicals - a Review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 53 p. 1-12, 2015.

FUESS, L. T. **Potencial contaminante e energético da vinhaça: riscos de contaminação ao solo e recursos hídricos e recuperação de energia a partir da digestão anaeróbica**. 2013. 161f. Dissertação (Mestrado em Geociências e Meio Ambiente) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro - SP, 2013.

FYTILI, D.; ZABANIOTOU, A. Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods - A review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 12, p. 116-140, 2008.

GARRIDO, C.; GURBUXANI, S.; RAVAGNAN, L.; KROEMER, G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 286, n. 3, p. 433-442, 2001.

GLÓRIA, N.; ORLANDO FILHO, J. Aplicação de vinhaça: Um resumo e discussões sobre o que foi pesquisado. **Álcool e Açúcar**, v. 4, n. 15, p. 22-31, 1984.

GODOY, J. A. P.; FONTANETTI, C.S. Diplopods as Bioindicators of Soils: Analysis of Midgut of Individuals Maintained in Substrat Containing Sewage Sludge. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 210, p. 389-398, 2010.

GOLOVATCH, S. I.; KIME, D. Millipede (Diplopoda) distributions: a review. **Soil Organisms**, v. 81, n. 3, p. 565-597, 2009.

GROTH, V. A.; CARVALHO-PEREIRA, T.; DA SILVA, E. M.; NIEMEYER, J. C. Ecotoxicological assessment of biosolids by microcosms. **Chemosphere**, v. 161, p. 342-348, 2016.

GUO, L., JURY, W. A.; WAGENET, R. J.; FLURY, M. Dependence of pesticide degradation on sorption: nonequilibrium model and application to soil reactors. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 43, n. 1, p. 45-62, 2000.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550-567, 2015.

HAN, Y. L.; YANG, W. X.; LONG, L. L.; SHENG, Z.; ZHOU, Y.; ZHAO, Y. Q.; WHANG, Y. F.; ZHU, J. Q. Molecular cloning, expression pattern, and chemical analysis of heat shock protein 70 (HSP70) in the mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris*: evidence for its role in regulating spermatogenesis. **Gene**, v. 575, n. 2, p. 331-338, 2016.

HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, v. 295, n. 5561, p. 1852-1858, 2002.

HENTATI, O.; LACHHAB, R.; AYADI, M.; KSIBI, M. Toxicity assessment for petroleum-contaminated soil using terrestrial invertebrates and plant bioassays. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 4, p. 2989-2998, 2013.

HIGHTOWER, L. E. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. **Cell**, v. 66, n. 2, p. 191-197, 1991.

HOPKIN, S. P.; WATSON, K.; MARTIN, M. H.; MOULD, M. L. The assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* and *Glomeris marginata* (Chilopoda; Diplopoda). **Bijdragen tot de Dierkunde**, v. 55, n. 1, p. 88-94, 1985.

HOPKIN, S. P. **Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invertebrates**. New York, Elsevier, 1989. 366p.

HOPKIN, S. P.; READ, H. J. **The biology of millipedes**. New York: Oxford University Press, 1992. 233p.

HUBERT M. Données histophysiologiques complémentaires sur les bioaccumulations minérales et puriques chez *Cylindroiulus londinensis* (Leach, 1814) (Diplopode, Iuloidea). **Archives de Zoologie Experimentale et Generale**, Paris, v. 119, p. 669–683, 1978.

HUBERT, M. Localization and identification of mineral elements and nitrogenous waste in Diplopoda. In: CAMATINI, M. (Ed.). **Myriapod Biology**. Academic Press: London, p. 127-134. 1979.

HUGUIER, P.; MANIER, N.; OWOJORI, O. J.; BAUDA, P.; PANDARD, P.; RÖMBKE, J. The use of soil mites in ecotoxicology: a review. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 1, p. 1-18, 2014.

IBGE — Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo 2010**, 2010. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/Tables_pdf/total_populacao_sao_paulo.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2017.

JIANG, Z. P.; LI, Y. R.; WEI, G. P.; LIAO, Q.; SU, T. M.; MENG, Y. C.; ZHANG, H.-I.; LU, C. Y. Effect of long-term vinasse application on physico-chemical properties of sugarcane field soils. **Sugar Tech**, v. 14, n. 4, p. 412-417, 2012.

JOLY, A. L.; WETTSTEIN, G.; MIGNOT, G.; GHIRINGHELLI, F.; GARRIDO, C. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. **Journal of innate immunity**, v. 2, n. 3, p. 238-247, 2010.

KAMMENGA J. E.; DALLINGER R.; DONKER M. H.; KOHLER H-R.; SIMONSEN V.; TRIEBSKORN R.; WEEKS J. M. Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 164, p. 93-147, 2000.

KAMPINGA, H. H.; CRAIG, E. A. The Hsp70 chaperone machinery: J-proteins as drivers of functional specificity. **Nature reviews - Molecular cell biology**, v. 11, n. 8, p. 579-592, 2010.

KEITH, A. M.; SCHMIDT, O.; MCMAHON, B. J. Soil stewardship as a nexus between Ecosystem Services and One Health. **Ecosystem Services**, v. 17, p. 40-42, 2016.

KENNEDY, D.; JÄGER, R.; MOSSER, D. D.; SAMALI, A. Regulation of apoptosis by heat shock proteins. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 66, n. 5, p. 327-338, 2014.

KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacology & therapeutics**, v. 80, n. 2, p. 183-201, 1998.

KNIGGE, T.; BACHMANN, L.; KÖHLER, H. R. An intron-containing, heat-inducible stress-70 gene in the millipede *Tachypodoiulus niger* (Julidae, Diplopoda). **Cell Stress and Chaperones**, v. 19, n. 5, p. 741-747, 2014.

KOCH, A.; MCBRATNEY, A.; ADAMS, M.; FIELD, D.; HILL, R.; CRAWFORD, J.; ANGERS, D.; GRUNWALD, S. Soil security: solving the global soil crisis. **Global Policy**, v. 4, n. 4, p. 434-441, 2013.

KRONE, P. H.; BLECHINGER, S. R.; EVANS, T. G.; RYAN, J. A.; NOONAN, E. J.; HIGHTOWER, L. E. Use of fish liver PLHC-1 cells and zebrafish embryos in cytotoxicity assays. **Methods**, v. 35, n. 2, p. 176-187, 2005.

LAIME, E. M. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 5, n. 3, p. 16-29, 2011.

LAL, R. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. **Science**, v. 304, n. 5677, p. 1623-1627, 2004.

LAL, R. Managing soils and ecosystems for mitigating anthropogenic carbon emissions and advancing global food security. **Bioscience**, v. 60, n. 9, p. 708-721, 2010.

LARA A. I.; ANDREOLI C. V.; PEGORINI E. S. Environmental impact assessment and monitoring of final sludge disposal. In: ANDREOLI C. V.; VON SPERLING M.; FERNANDES F. (Ed.) **Sludge Treatment and Disposal**. Londres: Iwa Publishing, 2007. p. 226-236.

LINDQUIST S.; CRAIG E. A. The heat shock proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 22, p. 631-637, 1988.

LIU, X. B.; ZHANG, X. Y.; WANG, Y. X.; SUI, Y. Y.; ZHANG, S. L.; HERBERT, S. J.; DING, G. Soil degradation: a problem threatening the sustainable development of agriculture in Northeast China. **Plant Soil and Environment**, v. 56, n. 2, p. 87-97, 2010.

LOPES, M. A. J. B. M. **Incorporacao de lodo de esgoto e seus efeitos sobre alguns atributos do solo cultivado com rabanete (*Raphanus sativus* L.)**. 2008. 99f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2008.

LUCHESE, E. B.; FAVERO, L. O. B.; LENZI, E. **Fundamentos da química do solo**. Rio de Janeiro, Freitas Bastos, 2001. 182p.

LUNZ, W.; NATALI, A. J. Exercício e proteínas de estresse (HSP 72) no músculo cardíaco. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 13, n. 3, p. 89-98, 2005.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

- MAHMOOD, K.; JADOON, S.; MAHMOOD, Q.; IRSHAD, M.; HUSSAIN, J. Synergistic effects of toxic elements on heat shock proteins. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-17, 2014.
- MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 23, n. 3/4, p. 303-309, 2006.
- MARINHO, J. F. U.; CORREIA, J. E.; DE CASTRO MARCATO, A. C.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C. S. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 110, p. 239-245, 2014.
- MAYER, M. P. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 38, n. 10, p. 507-514, 2013.
- MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and molecular life sciences**, v. 62, n. 6, p. 670-684, 2005
- McGEOCH, M. A. The selection, testing and application of terrestrial insects as bioindicators. **Biological Reviews**, v. 73, n. 2, p.181-201, 1998.
- MERLINI, V. V.; NOGAROL, L. R.; MARIN-MORALES, M. A.; FONTANETTI, C. S. Toxicity of trifluralin herbicide in a representative of the edaphic fauna: histopathology of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 1361-1369, 2012.
- MEYER, T. N.; SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 181-188, 1999.
- MONTANARELLA, L.; PENNOCK, D. J.; MCKENZIE, N.; BADRAOUI, M.; CHUDE, V.; BAPTISTA, I.; MAMO, T.; YEMEFACK, M.; VARGAS, R. World's soils are under threat. **Soil**, v. 2, n. 1, p. 79-82, 2015.
- MORALES, M.; PLANELLÓ, R.; MARTÍNEZ-PAZ, P.; HERRERO, O.; CORTÉS, E.; MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L.; MORCILLO, G. Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 150-158, 2011.
- MORAN-SALAZAR, R. G.; SANCHEZ-LIZARRAGA, A. L.; RODRIGUEZ-CAMPOS, J.; DAVILA-VAZQUEZ, G.; MARINO-MARMOLEJO, E. N.; DENDOOVEN, L.; CONTRERAS-RAMOS, S. M. Utilization of vinasses as soil amendment: consequences and perspectives. **SpringerPlus**, v.5, n.1, p.1-11, 2016.
- MORIMOTO, R. I. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. **Science, New Series**, v. 259, p. 1409-1409, 1993.
- MORINI, M., S., C.; SILVA, O. G. M.; ZAMBON V.; NOCELLI, R., C., F. Cultura De Cana-De-Açúcar No Brasil: Manejo, Impactos Econômicos, Sociais e Ambientais. In: FONTANETTI, C. S., BUENO, O. C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. Bauru - SP: Canal 6, 2017. p. 31-50.

MUKHOPADHYAY, I.; NAZIR, A.; SAXENA, D. K.; CHOWDHURI, D. K. Heat shock response: hsp70 in environmental monitoring. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 17, n. 5, 2003.

NADEAU D.; PLANTE I.; MORROW G.; TANGUAY R. M. Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*. **Cell Stress & Chaperones**, v. 6, n. 2, p. 153-163, 2001.

NASCIMENTO I. A.; PEREIRA S. A.; LEITE M. B. N. L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: ZAGATTO P. A., BETOLETTI E. (Ed.s) **Ecotoxicologia: Princípios e Aplicações**. São Carlos. RiMa, 2008. p. 413-432.

NASCIMENTO, A. L.; SAMPAIO, R. A.; BRANDAO JUNIOR; D. S., ZUBA JUNIOR, G.; FERNANDES, L. A. Crescimento e produtividade de semente de mamona tratada com lodo de esgoto. **Revista Caatinga**, v. 24, p. 145-151, 2011.

NATAL-DA-LUZ, T.; OJEDA, G.; COSTA, M.; PRATAS, J.; LANNON, R. P.; VAN GESTEL, C. A. M.; SOUSA, J. P. Short-term changes of metal availability in soil. II: the influence of earthworm activity. **Applied soil ecology**, v. 49, p. 178-186, 2011.

NETO, J. A. L. **Monitoramento de componentes químicos da vinhaça aplicados em diferentes tipos de solo**. 2008. 89f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2008.

NEUER, A.; SPANDORFER, S. D.; GIRALDO, P.; DIETERLE, S.; ROSENWAKS, Z.; WITKIN, S. S. The role of heat shock proteins in reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 2, p. 149-159, 2000.

NOGAROL, L. R.; FONTANETTI, C. S. Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: Tissue responses of the midgut. **Micron** (Oxford. 1993), v. 41, n. 3, p. 239-246, 2010.

NOLLEN, E. A.; MORIMOTO, R. I. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing heat shock proteins. **Journal of cell science**, v. 115, n. 14, p. 2809-2816, 2002.

OBARD, J. P. Ecotoxicological assessment of heavy metals in sewage sludge amended soils. **Applied Geochemistry**, v. 16, n. 11, p. 1405-1411, 2001.

OLIVEIRA, F. C. **Disposição de lodo de esgoto e composto de lixo urbano num latossolo vermelho-amarelo cultivado com cana-de-açúcar**. 2000. 247 p. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade de São Paulo, 2000.

OLIVEIRA, M. F.; BRIGHENTI, A. M. Comportamento dos herbicidas no ambiente. In: OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (Ed.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Ompax, 2011. p. 263-304 (Embrapa Milho e Sorgo).

PAOLIELLO, J. M. M. **Aspectos ambientais e potencial energético no aproveitamento de resíduos da indústria sulcroalcooleira**. 2006. 174 páginas. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial), Faculdade de Engenharia de Bauru, UNESP, Bauru - SP, 2006.

PARSELL, D. A.; LINDQUIST, S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 27, p. 437-496, 1993.

PASSUELO, A.; CADIACH, O.; PEREZ, Y.; SCHUHMACHER, M. A spatial multicriteria decision making tool to define the best agricultural areas for sewage sludge amendment. **Environment International**, v. 38, p. 1-9, 2012.

PEDROZA, M. M.; VIEIRA, G. E. G.; SOUSA, J. F.; PICKLER, A. C.; LEAL, E. R. M.; MILHOMEN, C. C. Produção e tratamento de lodo de esgoto – uma revisão. **Revista Liberato**, v. 11, p. 147-157, 2010.

PEIJNENBURG W.; CAPRI E.; KULA C.; LIESS M.; LUTTIK R.; MONTFORTS M.; NIENSTEDT K.; ROMBKE J.; SOUSA J. P.; JENSEN J. Evaluation of exposure metrics for effect assessment of soil invertebrates. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 42, p. 1862–1893, 2012.

PEREZ, D. G.; FONTANETTI, C. S. Assessment of the toxic potential of sewage sludge in the midgut of the diplopod *Rhinocricus padbergi*. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 128, p. 437-444, 2011.

PIGINO, G.; MIGLIORINI, M.; PACCAGNINI, E.; BERNINI, F.; LEONZIO, C. Fine structure of the midgut and Malpighian papillae in *Campodea (Monocampa) quilisi* Silvestri, 1932 (Hexapoda, Diplura) with special reference to the metal composition and physiological significance of midgut intracellular electron-dense granules. **Tissue and Cell**, Essex, v. 37, p. 223-232, 2005.

PIRES, A. M. M. **Uso agrícola do lodo de esgoto: aspectos legais**. Embrapa Meio Ambiente: Jaguariúna, 2006, 4p.

POWELL, J. R., EISENHAUER, N. Pedobiologia in 2015: the international year of soils. **Pedobiologia**, v. 58, p. 57–58, 2015.

POWERS, M. V.; WORKMAN, P. Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 581, n. 19, p. 3758-3769, 2007.

PRADO, E. A. F.; VITORINO, A. C. T.; MARCHI, G.; DE FREITAS MUNIZ, D. H.; DE SOUZA, T. A. Vinasse Dynamics on Soil Solution Under Sugarcane Crop: Inorganic and Organic Ion Analysis. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 145, p. 1-9, 2016.

RAHUL; JYOTI, S.; NAZ, F.; SIDDIQUE, Y. H. Evaluation of the toxic potential of cefotaxime in the third instar larvae of transgenic *Drosophila melanogaster*. **Chemico-biological interactions**, v. 233, p. 71-80, 2015.

REID, B. J.; JONES, K. C.; SEMPLE, K. T. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments - a perspective on mechanisms, consequences and assessment. **Environmental Pollution**, v. 108, n. 1, p. 103-112, 2000.

- RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.18, n. 12, p. 571-573, 1962.
- RITOSSA, F. M. Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of *Drosophila*. **Experimental cell research**, v. 35, n. 3, p. 601-607, 1964.
- RÜDIGER, S.; GERMEROOTH, L.; SCHNEIDER-MERGENER, J.; BUKAU, B. Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. **The EMBO journal**, v.16, n.7, p.1501-1507, 1997.
- RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados: Uma abordagem funcional-evolutiva**. 6. ed. São Paulo: Editora Roca Ltda., 2005. 1029 p.
- RYAN, J. A.; HIGHTOWER, L. E. Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology. **Stress-inducible Cellular Responses**, v. 77, p. 411-424, 1996.
- SANDERS, B. M.; MARTIN, L. S. Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples. **Science of the total environment**, v.139, p.459-470, 1993.
- SANTOS, J. A. G. Poluição do solo e da água. In: ARAUJO, Q. R. (Org.). **500 anos de uso de solo no Brasil**. XIII Reunião Brasileira de Manejo e Conservação do Solo e da Água (XIII RBMCSA). Ilhéus, Bahia: Editus, 2002. p. 239-246.
- SCHUBART, O. Os Myriapodes e suas relações com a agricultura. **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v. 2, n. 16, p. 205-234, 1942.
- SEMPLE, K. T.; MORRISS, A. W. J.; PATON, G. I. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. **European journal of soil science**, v. 54, n. 4, p. 809-818, 2003.
- SHINBROT, X. Biosolids or Biohazards? **Pesticides and You**, v.32, n. 3, p. 9-15, 2012
- SILVA, A. F.; CARRASCHI, S. P.; GÍRIO, A. C. F.; NETO, A. N.; CRUZ, C.; PITELLI, R. A. Ecotoxicidade da vinhaça para o peixe mato grosso (*Hyphessobrycon eques*) e para a macrófita lentilha d'água (*Lemna minor*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 41, n. 3, p. 557-565, 2015.
- SILVA, M. A.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108-114, 2007.
- SOCHOVÁ, I.; HOFMAN, J.; HOLOUBEK, I. Using nematodes in soil ecotoxicology. **Environment International**, v. 32, n. 3, p. 374-383, 2006.
- SOTO M. A. L.; BASSO, J. B.; K. C. H. Impacto da Fertirrigação da Cana-De-Açúcar por Vinhaça nas Propriedades Físicas, Químicas e Hidráulicas do Solo. In: FONTANETTI, C. S., BUENO, O. C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. Bauru - SP: Canal 6, 2017. p. 103-125.

SOTO, M. A. A.; BASSO, J. B.; KIANG, C. H.; VAN GENUCHTEN, M. T. Simulação de fluxo e transporte de íons de vinhaça através de vertente da formação Rio Claro. **Águas Subterrâneas**, v. 29, n. 2, p.162-174, 2015

SOUSA, A.; PEREIRA, R.; ANTUNES, S. C.; CACHADA, A.; PEREIRA, E.; DUARTE, A. C.; GONÇALVES, F. Validation of avoidance assays for the screening assessment of soils under different anthropogenic disturbances. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 3, p. 661-670, 2008.

SOUZA, R. B.; MAZIVIERO, G. T.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; PINHEIRO, T. G.; FONTANETTI, C. S. Soil contamination with heavy metals and petroleum derivates: impact on edaphic fauna and remediation strategies. In: SORIANO, M.C.H (Ed.). **Soil Process and Current Trends in Quality Assessment**. InTech - Open Access Company, p. 175-203, 2013.

SOUZA, R. B.; FONTANETTI, C. S. Alterations in the fat body cells of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda), resulting from exposure to substrate containing sewage sludge. **Microscopy and Microanalysis**, v. 18, p. 317-323, 2012.

SOUZA, T. S.; ANGELIS, D. F.; FONTANETTI, C. S. Histological and histochemical analysis of the fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda) exposed to contaminated industrial soil. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 221, p. 235-244, 2011.

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. Morphological biomarkers in the *Rhinocricus padbergi* midgut exposed to contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 10-18, 2011.

SOUZA, T., S.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; BOZZATTO, V.; FONTANETTI, C. S. The use of diplopods in soil ecotoxicology - A review. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 103, p. 68-73, 2014.

SREEDHAR, A. S.; PARDHASARADHI, B. V. V.; BEGUM, Z.; KHAR, A.; SRINIVAS, U. K. Lack of heat shock response triggers programmed cell death in a rat histiocytic cell line. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 456, n. 2, p. 339-342, 1999.

SRIVASTAVA, N.; SAHAI, R. Effects of distillery waste on the performance of *Cicer arietinum* L. **Environmental Pollution**, v. 43, p. 91-102, 1987

SSA - Soil Science Society of America. **Glossary of Soil Science Terms**. South Segoe Road Madison: Soil Science Glossary Terms Committee, 2008. 92 p.

SUTHAR, S.; SINGH, S. Bioconcentrations of metals (Fe, Cu, Zn, Pb) in earthworms (*Eisenia fetida*), inoculated in municipal sewage sludge: do earthworms pose a possible risk of terrestrial food chain contamination? **Environmental toxicology**, v. 24, n. 1, p. 25-32, 2009.

SWIFT M. J.; HEAL O. W.; ANDERSON J. M. Decomposition in Terrestrial Ecosystems. Berkeley: University of California Press, 1979. v. 5. 372p.

TISSIÉRES, A.; MITCHELL, H. K.; TRACY, U. M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. **Journal of molecular biology**, v. 84, n. 3, p. 389-398, 1974.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol - safra2016/2017**. 2017. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br>>. Acesso em 1 ago. 2017.

VERLICCHI, P.; ZAMBELLO, E. Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: occurrence and environmental risk in the case of application on soil: a critical review. **Science of the Total Environment**, v. 538, p. 750-767, 2015.

WALISZEWSKI, K. N.; ROMERO, A.; PARDIO, V. T. Use of cane condensed molasses solubles in feeding broilers. **Animal feed science and technology**, v. 67, n. 2-3, p. 253-258, 1997.

WHITE, P. A.; CLAXTON, L. D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutation Research**, v. 567, n. 2, p. 227-345, 2004.

WOLTERS, V. Invertebrate control of soil organic matter stability. **Biology and fertility of Soils**, v. 31, n. 1, p. 1-19, 2000.

YANG, S. D.; LIU, J. X.; WU, J.; TAN, H. W.; LI, Y. R. Effects of vinasse and press mud application on the biological properties of soils and productivity of sugarcane. **Sugar Tech**, v. 15, n. 2, p. 152-158, 2013.

ZANGER M.; ALBERTI G.; KUHN M.; KÖLHER H-R. The stress-70 protein family in diplopods: induction and characterization. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 165, p. 622–627, 1996.

ZANGER, M.; KÖHLER, H.R. Colour change: a novel biomarker indicating sublethal stress in the millipede *Julus scandinavius* (Diplopoda). **Biomarkers**, v. 1, p. 99–106, 1996.