

Vanessa Vanderléia Merlini

Avaliação do efeito tóxico do herbicida trifluralina
por meio do estudo histológico e histoquímico do
intestino médio do diplópodo *Rhinocricus
padbergi*

VANESSA VANDERLÉIA MERLINI

AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DO HERBICIDA TRIFLURALINA
POR MEIO DO ESTUDO HISTOLÓGICO E HISTOQUÍMICO DO
INTESTINO MÉDIO DO DIPLÓPODO *Rhinocricus padbergi*

Orientadora: PROF^a. Dr^a. CARMEM S. FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

Co-orientadora: LARISSA ROSA NOGAROL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção dos graus
de Bacharel e Licenciado em Ciências
Biológicas.

Rio Claro
2011

581.652 Merlini, Vanessa Vanderléia
M565a Avaliação do efeito tóxico do herbicida trifluralina por meio do estudo
histológico e histoquímico do intestino médio do diplópodo *Rhinocricus*
padbergi. / Vanessa Vanderléia Merlini. - Rio Claro : [s.n.], 2011
48 f. : il., figs., tabs.

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

Orientador: Carmem S. Fontanetti Christofolletti
Co-Orientador: Larissa Rosa Nogarol

1. Herbicida. 2. Milípede. 3. Tubo digestório. 4. Agrotóxico. I. Título.

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

*Dedico a minha querida
e amada mãe.*

Agradecimentos

Gostaria em primeiro lugar de agradecer a Deus por ter me concedido a graça de ter cursado uma excelente universidade e por ter me sustentado durante estes cinco anos de caminhada, por nunca ter me deixado desistir. Agradeço aos meus pais em especial a minha querida mãe (*in memoriam*) mesmo sem tê-la aqui sei que esteve comigo em todos os momentos nos quais mais precisei, mas agradeço principalmente pela educação que me deu, pela força de seu amor por mim e pelo seu exemplo de ser humano.

Durante esta trajetória muitas pessoas especiais fizeram parte da minha vida sem dúvida uma delas é o meu querido noivo Everton, a ele faço um agradecimento especial, obrigada pelo seu amor, paciência, carinho, força, com certeza sem você eu jamais teria conseguido chegar até aqui, você sempre me incentivou a prosseguir mesmo quando tudo parecia não ter solução, divido com você meu amor os títulos que terei, pois você os merece tanto quanto eu, obrigada por tornar a minha vida cada dia mais feliz. Amo você!

Agradeço a minha querida orientadora Carmem pelo carinho e respeito que sempre teve por mim, ela é sem dúvida um belo exemplo de ser humano e profissional. Agradeço também a minha querida co-orientadora, a Lari, além de me co-orientar muito bem se tornou para mim uma amiga, obrigada por toda a ajuda, pelo incentivo, ela sempre tinha uma palavra amiga pra me dizer.

Agradeço aos meus companheiros de pesquisa a Cyntia, Janaína, Bairral, Tamaris, Cris, Matraca, Jorge, ao técnico Gerson Mello Souza por toda ajuda no laboratório e pela alegria contagiante, à Cristiane M. Mileo pela ajuda na montagem das pranchas.

Agradeço também aos meus colegas de sala, principalmente a Keyla, Cris, Flávia, Mari e Junior, pessoas especiais que fizeram parte dessa caminhada, sucesso a todos vocês! Muito obrigada a todos os meus amigos que de uma forma ou outra participaram da realização de mais um sonho em minha vida, em especial a minha amiga Goreti que desde muito cedo me incentivou a estudar.

Enfim, agradeço a PROEX e a FAPESP pelo apoio financeiro.

“As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos”.

(Clarice Lispector)

RESUMO

Atualmente, o uso de agrotóxicos na agricultura é muito disseminado pela grande eficácia no combate a pragas, ervas daninhas e doenças, contribuindo para uma melhor produtividade e rendimento econômico na área agrícola. O uso de agroquímicos atinge o mundo todo e muitas vezes a sua utilização é feita de modo abusivo, indiscriminado e por longos períodos. Várias pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de verificar a presença de agrotóxicos na natureza, com resultados preocupantes. A presença de níveis altíssimos de agroquímicos e seus produtos de degradação em solos e águas superficiais e subterrâneas vêm indicando contaminações cada vez maiores. Dentre os agroquímicos mais utilizados, estão presentes os herbicidas e dentre estes a trifluralina tem ocupado um lugar relevante devido ao seu amplo uso; é um herbicida proveniente de derivados benzênicos pertencentes à família da dinitroanilina; é classificada como pertencente ao grupo C, sendo possivelmente carcinogênico em humanos, possui alta persistência no solo como consequência da sua baixa mobilidade, podendo desta maneira afetar a fauna edáfica local. Os diplópodos compreendem um grupo de invertebrados importantes na dinâmica do solo; por possuírem um íntimo contato com o mesmo, estes animais podem ser utilizados como bioindicadores na toxicidade de substratos. O presente trabalho objetivou por expor espécimes de diplópodos da espécie *R. padbergi*, a diferentes concentrações de trifluralina desta forma, foram montados cinco bioensaios contendo terra proveniente do local de coleta dos animais (grupo controle) e a mesma terra misturada ao herbicida trifluralina em diferentes concentrações (concentração indicada para uso agrícola, sendo a dose recomendada pelo fabricante de $0,0534 \text{ g/m}^2$, o dobro, a metade e um quarto desta dose), os animais foram expostos por 7 e 90 dias. Durante o período total de exposição (90dias), verificou-se que o número de animais do bioensaio controle permaneceu estável até a 5ª semana, com apenas uma morte neste período. No bioensaio campo, a estabilidade se manteve até a 8ª semana e no bioensaio dobro até a 7ª semana; os três bioensaios chegaram a 12ª semana com a mesma taxa de sobrevivência. Tanto no bioensaio um quarto quanto no bioensaio metade, a estabilidade se manteve até 4ª semana; os indivíduos do bioensaio um quarto sobreviveram até 88º dia e o bioensaio metade até o 89º dia. Depois de expostos pelos referidos períodos, os animais foram anestesiados e dissecados para remoção do intestino médio; o material foi então submetido à rotina histológica e técnicas histoquímicas para detecção de proteínas, cálcio e polissacarídeos neutros. Após a análise foi possível observar que o grupo controle dos dois períodos apresentou o padrão normal para a espécie, já os animais expostos apresentaram como principais alterações tissulares: acúmulo de grânulos citoplasmáticos na camada de células hepáticas, aumento na liberação de vesículas de secreção, aumento da taxa de renovação epitelial, aumento na ocorrência de hemócitos, vacuolização das células principais, dilatação do espaço intercelular e desestruturação do epitélio. Desta maneira, conclui-se que o uso prolongado desse herbicida provoca danos ao epitélio intestinal do animal estudado, sendo importante se fazer um uso adequado e consciente do produto, por períodos curtos.

Palavras-chave: milípede, tubo digestório, agrotóxico, toxicologia, histopatologia.

ABSTRACT

Currently the use of pesticides in agriculture is widespread due to their high effectiveness in combating pests, weeds and diseases leading to better productivity and economical performance in agricultural area. The use of pesticides affects the whole world and their use is often performed in an improper and indiscriminate way and for long periods. Several studies have been carried out in order to verify the presence of pesticides in nature, with worrying results. The presence of higher levels of pesticides and their degradation products in soil and surface and groundwater have indicated increasing contamination. Among the most widely used pesticides, herbicides are present and among these trifluralin has occupied an important place due to its widespread use; it is an herbicide originated from benzene derivatives belonging to dinitroanilines family; it is classified as belonging to group C, being possibly carcinogenic for humans, present a high persistence in soil as a result of its low mobility and therefore may affect local edaphic fauna. Diplopods belong to a group of invertebrates considered important in the soil dynamics; due to their close contact with it, these animals can be used as bioindicators of substrates toxicity. This study aimed to expose diplopod specimens of the species *R. padbergi* to different concentrations of trifluralin and therefore it was mounted five bioassays containing soil from the site where animals were collected (control group) and the same soil mixed to different concentrations of trifluralin herbicide (concentration recommended for agriculture use, that is, the dose recommended by the producer 0.0534g/m^2 , double, haft and quarter of this dose), animals were exposed for 7 and 90 days. During the entire period of exposure (90 days), it was observed that the number of animals in the control bioassay remained stable until the 5th week, presenting only one death in this period. In the field bioassay, stability was kept until 8th week and in the double bioassay until 7th week; these three bioassays reached the 12th week with the same survival rate. In both, the quarter and haft bioassays, stability was maintained up to the 4th week; individuals from the quarter bioassay survived until the 88th day and from the haft bioassay until the 89th day. After exposure, animals were anesthetized and dissected in order to remove the midgut; then the material was submitted to histological routine and histochemical techniques for the detection of proteins, calcium and neutral polysaccharides. After analysis it was observed that the control group of the two periods showed normal pattern as described for the species. On the other hand, animals exposed showed as main tissular alterations: accumulation of cytoplasmatic granules in the hepatic cell layer, increased release of secretion vesicles, increased epithelial renewal rate, increased occurrence of haemocytes, vacuolization of main epithelial cells, dilatation of intercellular spaces and disruption of the epithelium. Thus, it is concluded that prolonged use of this herbicide causes damages to this animal's midgut epithelium, being important to achieve a conscious and appropriate use of the product for short periods.

Keywords: milípede, digestive tract, pesticides, toxicology, histopathology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	08
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 A espécie <i>R. padbergi</i> : estudos morfológicos e ecotoxicológicos.....	12
2.2 O herbicida trifluralina e sua toxicidade.....	13
2.3 A ação da trifluralina no solo.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Material.....	19
4.1.1 Material biológico.....	19
4.1.2 Montagem de Bioensaios.....	19
4.2. Métodos.....	20
4.2.1 Histologia.....	20
4.2.2 Histoquímica.....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1. Biomonitoramento.....	22
5.2. Análise do intestino médio.....	22
ARTIGO.....	23
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o uso de agrotóxicos na agricultura é muito disseminado pela grande eficácia no combate a pragas, ervas daninhas e doenças, contribuindo para uma melhor produtividade e rendimento econômico na área agrícola.

A utilização de agrotóxicos proporciona uma maior disponibilidade de alimentos para a população e a sua falta poderia acarretar danos drásticos nesta disponibilidade, inclusive, aumento de preço dos alimentos (FERNANDES, 2005).

Embora a utilização de agentes químicos seja importante, nem todas as conseqüências do uso foram estudadas e a utilização demasiada causa danos à saúde dos seres humanos e afeta diretamente o meio ambiente. O uso de agroquímicos é prática no mundo todo e muitas vezes a sua utilização é feita de modo abusivo e indiscriminado e por longos períodos, trazendo preocupações às autoridades públicas e a entidades envolvidas com a saúde e sustentabilidade dos recursos naturais, pois possíveis contaminações ambientais podem ocorrer (UETA et al., 1998).

Várias pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de verificar a presença de agrotóxicos na natureza, com resultados preocupantes; a presença de níveis altíssimos de agroquímicos e seus produtos de degradação em solos e águas superficiais e subterrâneas vêm indicando contaminações cada vez maiores (UETA et al., 1998).

Mesmo nas regiões polares onde não há nenhum tipo de agricultura, são detectados resíduos de inseticidas organoclorados como dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) e dicloro-defenil-etilcloro (DDE) em tecido adiposo de leões marinhos e de outros mamíferos aquáticos (GRISOLIA, 2005).

Diante de tal problemática, há necessidade de mais estudos e avaliações de impactos ambientais e impactos sobre a saúde humana, visto que a contaminação ocorre de maneira variada e por longos períodos, assim a conscientização da população é de grande importância.

O Brasil possui uma lei específica sobre agrotóxicos (Lei dos Agrotóxicos-Lei nº 7.802/89), regulamentando seu uso em todo o território, que apresenta os mesmos moldes de leis dos países europeus, dos Estados Unidos e do Canadá, que proíbem o uso de agrotóxicos que apresentem características de carcinogenicidade, mutagenicidade e teratogenicidade, que provoquem distúrbios hormonais e que causem danos ao meio ambiente. Após 15 anos da implantação desta lei no Brasil, nenhum agrotóxico sofreu nenhum tipo de restrição, mesmo sendo avaliado no processo de registro, a eficácia agrônômica pelo Ministério da Agricultura, de toxicidade à saúde humana pelo Ministério da Saúde e de periculosidade ao meio ambiente

pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA), sendo o órgão responsável pelo registro, o Ministério da Agricultura (GRISOLIA, 2005).

Dependendo do tipo de alvo ao qual se destina o produto químico, este recebe diferentes denominações; inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, entre outros; todo este conjunto de produtos químicos recebe o nome de defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, produtos fitossanitários ou agrotóxicos (este último termo restrito ao Brasil, por força da Lei nº 7.802/89); portanto, para que estes produtos sejam utilizados, paralelamente aos estudos sobre o uso, a eficiência e a eficácia, os produtos químicos devem ser analisados quanto aos perigos e riscos à saúde humana e ambiental (KOTAKA; ZAMBRONE, 2001).

Dentro do grupo dos agrotóxicos, os herbicidas são os mais utilizados na agricultura podendo chegar a 65%; têm como função controlar plantas daninhas (LORENZI, 1990). Um grande problema das plantas daninhas é a competição destas com os cultivares, por meio da extração de elementos do solo que são vitais, como a água, luz, CO₂ e nutrientes, desta maneira provocam uma interferência na produtividade dessas plantações; no Brasil as perdas devido a essa interferência chegam em torno de 20-30% (LORENZI, 1990).

Os herbicidas são divididos em duas grandes classes distintas, sendo considerados inorgânicos e orgânicos. As dinitroanilinas pertencem ao grupo dos herbicidas orgânicos e este grupo tem por base a estrutura da anilina, contendo moléculas de NO₂ nas posições 2 e 6 ou 3 e 5 do anel. Este grupo possui mais de 10 tipos diferentes de herbicidas, entre os quais estão presentes a trifluralina, dinitramine, orizalina e pendimetaline (DEUBER, 1992).

Os herbicidas do grupo das dinitroanilinas, em geral, são sensíveis à radiação ultravioleta. A trifluralina além de ser fotossensível possui volatilidade mediana e é pouco lixiviável (DEUBER, 1992); sua persistência média no solo para doses recomendadas em condições de campo é de 1,8 ppm de resíduo após 180 dias da sua aplicação, podendo esta quantidade variar de acordo com o tipo de solo e das condições climáticas (ALMEIDA, 1985). A degradação da trifluralina no solo pode ocorrer por via química, microbiana e por fotólise. A degradação microbiana se mostra bem eficiente, podendo ocorrer de forma aeróbica e anaeróbica, sendo a aeróbica responsável por 25% de degradação e a anaeróbica podendo chegar a 98% de degradação (FERNANDES, 2005). A degradação também pode ser afetada pelo tipo de solo, teor de umidade, razão e método de incorporação (TAVARES et al., 1996).

A trifluralina é um herbicida de derivados benzênicos pertencentes à família da dinitroanilina (BYRD et al., 1995); a principal característica dos herbicidas pertencentes à esta família é sua alta persistência no solo como consequência da sua baixa mobilidade

(CALDERON et al., 1999). Sua composição química é: α,α,α -trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropil-p-toluidina, sendo usada de forma pré-emergente com incorporação ao solo (MACHADO et al., 2004). É suscetível a decomposição pela radiação ultravioleta (PROBST et al., 2002), sendo fortemente adsorvido em solos com alto teor de matéria orgânica, portanto, não sendo recomendado seu uso em solos com esta composição (RODRIGUÊS; ALMEIDA, 1985); é um dos herbicidas mais utilizados no Brasil.

A trifluralina, conforme a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (EPA, 2000) pertence ao grupo C, sendo possivelmente carcinogênico em humanos, baseado em evidências com animais e não com humanos, podendo causar possíveis danos hepáticos com exposição por aspiração (RODRIGUÊS; ALMEIDA, 1985).

Fernandes et al. (2007) avaliaram a potencialidade de indução de micronúcleos e de outras alterações celulares, em meristemas radiculares de *Allium cepa*, após exposição ao herbicida trifluralina, apresentando como resultado, a inibição do índice mitótico e a presença de micronúcleos, “mini cells”, núcleos irregulares e alterações cromossômicas, tais como células poliplóides e perdas cromossômicas, evidenciando o potencial mutagênico e genotóxico da trifluralina.

Tendo em vista a necessidade de estudos para um maior conhecimento dos efeitos causados ao meio ambiente pelos agrotóxicos, vários testes têm sido realizados com a finalidade de obter respostas quanto ao manejo adequado de tais produtos.

Segundo Grisolia (2005) várias análises são feitas para uma avaliação do comportamento ambiental, dentre elas análises do solo, água e também testes ecotoxicológicos em que se utiliza aves, mamíferos, peixes, minhocas e abelhas.

Godoy e Fontanetti (2010) utilizaram diplópodos como bioindicadores na análise de solo misturado a lodo de esgoto, proveniente de uma Estação de Tratamento de Esgoto do estado de São Paulo. De modo semelhante, Nogarol e Fontanetti (2010) estudaram a exposição aguda e subcrônica de diplópodos, também expostos a substrato contendo lodo de esgoto. Nos dois estudos foram realizadas análises morfológicas dos intestinos médios do diplópodo *Rhinocricus padbergi*, nas quais se demonstrou diferentes respostas tissulares como forma de proteção dos animais contra as substâncias tóxicas.

Os diplópodos ocorrem em todas as zonas zoogeográficas, especialmente nos trópicos, habitam lugares úmidos, embaixo de folhas, pedras ou pedaços de madeira ou solos, sempre se abrigando da luz, sendo encontrados em diversos microhabitats. Podem colonizar diferentes estratos do solo, sendo estes utilizados para abrigo e área de alimentação, promovendo aeração (HOPKIN; READ, 1992). É o terceiro maior grupo dentro dos

artrópodes terrestres e possuem adaptações que lhes permitem ser bastante difundido na maioria das paisagens e dos cintos de vegetação natural. Somente em condições extremas de frio e em ambientes de deserto estão quase ou totalmente ausentes (KIME et al., 2000).

Os diplópodos têm-se mostrado animais promissores na avaliação da qualidade do solo (TRIEBSKORN, et al., 1991; KÖHLER; TRIEBKORN, 1998; GODOY; FONTANETTI, 2010, NOGAROL; FONTANETTI, 2010); no Brasil, são conhecidos também como piolho-de-cobra, emboá ou gongolô.

A espécie de diplópodo escolhida para o desenvolvimento deste projeto foi *R. padbergi*, devido a sua abundância e fácil coleta na região onde o trabalho será realizado, e pelo histórico de trabalhos desenvolvidos com a mesma (CAMARGO-MATHIAS et al., 1998; 2004; FANTAZZINI et al., 1998; 2002; CAMARGO-MATHIAS; FONTANETTI, 2000; ARAB et al., 2003; FONTANETTI; CAMARGO-MATHIAS, 2004; FONTANETTI et al., 2006).

Diante do exposto o presente trabalho teve como proposta a avaliação das possíveis alterações morfológicas do intestino médio do diplópodo *R. padbergi*, bem como alterações comportamentais destes animais quando expostos ao herbicida trifluralina. O íntimo contato da espécie com o solo, como integrante importante da macrofauna edáfica justifica sua utilização como organismo teste neste estudo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A espécie *R. padbergi*: estudos morfológicos e ecotoxicológicos

Os representantes da classe Diplopoda caracterizam-se pela presença de segmentos duplos, dotados de dois pares de pernas. O tamanho desses animais pode variar de 2 mm a 30 cm de comprimento e a coloração varia do negro ao marrom, podendo ser encontrados organismos com tons de vermelhos ou alaranjados (RUPPERT et al., 2005). Os diplópodos são popularmente conhecidos no Brasil como piolho-de-cobra, emboá ou gongolo (FONTANETTI et al., 2006).

A classe Diplopoda possui um dos maiores grupos de organismos de solo, compreendendo cerca de 12.000 espécies já descritas, entretanto possui uma diversidade estimada de cerca de 80.000 espécies (HOFFMAN et al., 2002). É o terceiro maior grupo dentro dos artrópodes terrestres e possuem adaptações que lhes permitem ser bastante difundido na maioria das paisagens e dos cintos de vegetação natural, podem ser encontrados em diversos habitats, principalmente em ambientes escuros e úmidos, além de viverem embaixo de pedras e em matéria orgânica em decomposição. Somente em condições extremas de frio e em ambientes de deserto estão quase ou totalmente ausentes (KIME et al., 2000). Este grupo é muito importante, pois provoca a aeração e enriquecimento do solo, promovendo desta maneira um solo de melhor qualidade.

Estudos da anatomia e histologia do tubo digestivo dos milípedes são escassos; uma grande contribuição neste sentido foi obtida pelos trabalhos de Fantazzini et al. (1998, 2002) nos quais foram estudados a anatomia do tubo digestório, e a histologia e histoquímica do intestino médio da espécie *R. padbergi*. O trato digestivo desses animais é constituído basicamente de um tubo reto que se estende desde a boca até o ânus. Nesta espécie, o intestino médio representa cerca de 39% do comprimento total do tubo digestório; histologicamente é constituído por um epitélio pseudoestratificado, o qual apresenta células principais, células regenerativas e células secretoras, além de uma membrana basal, uma camada muscular, seguido por uma camada de células hepáticas em diferenciação; anteriormente denominada camada de "corpo gorduroso" do intestino médio, este novo termo foi proposto devido a sua similaridade com as células do hepatopâncreas de alguns invertebrados e seu atuante papel em processos de detoxicação.

As células principais do epitélio possuem um bordo em escova bem desenvolvido no domínio apical, além de núcleos localizados na metade superior, com formas que variam do

arredondado ao oval. Já as células regenerativas são menores, de núcleo esférico, encontradas na região basal, intercaladas com as células principais. Posteriormente, foi realizada a análise ultra-estrutural do intestino médio da mesma espécie (CAMARGO-MATHIAS et al., 2004).

O uso de diplópodos como organismo teste na avaliação da qualidade do solo, bem como de sua toxicidade, vem se mostrando uma promissora possibilidade para pesquisas desta natureza, uma vez que este possui um íntimo contato com o solo (TRIEBSKORN, et al., 1991; KÖHLER; TRIEBSKORN, 1999; GODOY; FONTANETTI, 2010, NOGAROL; FONTANETTI, 2010; PEREZ; FONTANETTI, 2011a; SOUZA; FONTANETTI, 2011).

A espécie *R. padbergi*, ordem Spirobolida, tem sido utilizada com a finalidade de avaliar a toxicidade de diferentes amostras de lodo de esgoto oriundas de diferentes Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) do estado de São Paulo, Brasil. As alterações histológicas observadas no intestino foram similares para todas as amostras utilizadas, como: aumento de grânulos citoplasmáticos presentes na camada de células hepáticas, aumento na taxa de renovação epitelial, aumento na presença de hemócitos, agrupados ou não (GODOY; FONTANETTI, 2010, NOGAROL; FONTANETTI, 2010, PEREZ; FONTANETTI, 2011a). Estudos da ultra-estrutura de animais afetados pelo lodo de esgoto também foram realizados e indicaram alterações como: vacuolização citoplasmática nas células epiteliais e perda da integridade da membrana das células pertencentes à camada de células hepáticas; as autoras, concluíram que o lodo de esgoto possui também potencial genotóxico para os diplópodos, uma vez que provocou danos no núcleo das células (NOGAROL; FONTANETTI, 2011).

Segundo Souza e Fontanetti (2011), as alterações acima citadas também foram observadas quando exemplares de *R. padbergi* foram expostos a solo industrial contaminado com hidrocarbonetos cíclicos aromáticos e metais.

2.2. O herbicida trifluralina e sua toxicidade

No Brasil, devido ao modelo de agricultura utilizado, o uso de agrotóxicos se tornou cada vez mais intensivo e muitos problemas relacionados à contaminação do meio ambiente passou a ser cada dia mais comum (SILVA et al., 2007).

Entretanto, a utilização de produtos agroquímicos proporciona um aumento na produtividade agrícola, auxiliando no combate de plantas daninhas, além de vetores de diversas doenças. O problema localiza-se no uso excessivo e desordenado desses produtos o que tem provocado inúmeros impactos ambientais, dentre os quais podem ser citados, a presença de resíduos no solo, na água, no ar, em plantas e animais (SILVA et al., 2007).

Mesmo nas regiões mais distantes do planeta, sem nenhum tipo de agricultura, sem atividade industrial, como as polares, pode-se destacar resíduos de inseticidas organoclorados como dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) em tecido adiposo de leões marinhos e outros mamíferos aquáticos (GRISOLIA, 2005).

Tendo em vista o uso demasiado de produtos químicos na agricultura, o Brasil criou uma lei que regulamenta e classifica os agrotóxicos, definindo qual é a função destes agentes químicos no meio ambiente; por força da Lei 7.802, de 11 de julho de 1989, art. 2º inciso I, os agrotóxicos são classificados como: a) “os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (MACHADO, 2001). Há também a portaria (Portaria de 03 de Janeiro de 1992) que se refere a “diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins” (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 1991).

Dentre todos os tipos de ambiente em que os resíduos de agrotóxicos estão presentes pode-se destacar o terrestre, por possuir partículas, as quais absorvem os produtos químicos durante o processo de degradação biótica ou abiótica. Os impactos sobre os solos variam de acordo com suas características físicas e com o tipo de microflora (GRISOLIA, 2005).

Os herbicidas podem ser classificados segundo diferentes critérios, relacionados às suas propriedades, características, uso, eficácia e permanência no ambiente (DEUBER, 1992). Podem ainda ser classificados quanto ao seu caráter químico, como: carbamatos, amidas, difeniléteres, aminofosforado, dinitroanilinas, entre muitos outros.

Dentre os agrotóxicos, os herbicidas constituem o grupo mais empregado na agricultura (aproximadamente 65%) (LORENZI, 1990).

A trifluralina (α,α,α -trifluorometil-2,6-dinitro-N,N-dipropil-p-toluidina) é um dos herbicidas mais comuns utilizados no controle de ervas daninhas de diversas culturas agrícolas (fig. 1). Pertence a classe das dinitroanilinas, sendo usada de forma pré-emergente com incorporação ao solo (MACHADO et al., 2004). O uso anual no mundo é de cerca de 12 milhões de toneladas. Este herbicida pode ser encontrado sob a forma de uma emulsão concentrada ou na forma de um sólido cristalino alaranjado; sua solubilidade em água é baixa, medianamente volátil, sendo considerado alcalino (DEUBER, 1992). Em solos utilizados para

agricultura, sob condições anaeróbicas, a trifluralina pode ser rapidamente degradada (TOR et al., 2000).

O herbicida pertencente ao grupo das dinitroanilinas tem por base a estrutura da anilina, contendo moléculas de NO₂ nas porções 2 e 6 ou 3 e 5 do anel (DEUBER, 1992).

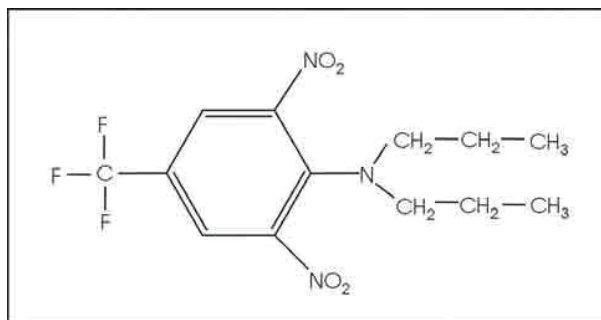


Figura 1: Estrutura química do herbicida trifluralina. Fonte: Bellinaso, 2003.

Conforme a Portaria 03 de 16 de janeiro de 1992, o herbicida trifluralina é considerado altamente tóxico (classe toxicológica II) e muito perigoso (classe II) quanto ao seu potencial de periculosidade ambiental estabelecido pela Portaria Normativa n. 139 de 21 de dezembro de 1994 do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), com base no decreto n. 98.816/90. A USEPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) classificou a trifluralina pertencente ao grupo C, possivelmente carcinogênico em humanos.

Nas plantas, este herbicida provoca a inibição do processo de divisão celular mitótica, atuando basicamente sobre os meristemas e tecidos dos órgãos subterrâneos como, raízes, gemas, rizomas e sementes (DEUBER, 1992).

Estudos com carpas foram realizados com a finalidade de determinar a toxicidade do herbicida trifluralina; as alterações mais graves foram observadas nas brânquias e rins, provavelmente devido ao importante papel desses órgãos na eliminação rápida de compostos, podendo ainda tornar os peixes mais sensíveis às mudanças climáticas e menos resistentes às doenças (POLEKSIC et al., 1999).

Trabalhos com o peixe *Cyprinodon variegatus* indicaram que mesmo em concentrações baixas, a trifluralina pode causar displasia vertebral, ou seja, as vértebras apresentam paredes hipertrofiadas (COUCH et al., 1979).

Fernandes et al. (2007) avaliaram a potencialidade de indução de micronúcleos e de outras alterações celulares, em meristemas radiculares de *Allium cepa*, após exposição ao herbicida trifluralina, apresentando como resultado, a inibição do índice mitótico e a presença de micronúcleos, “mini cells”, núcleos irregulares e alterações cromossômicas, tais como

células poliplóides e perdas cromossômicas, evidenciando o potencial mutagênico e genotóxico da substância.

A avaliação da qualidade do solo, resultante de um derramamento de produtos químicos, pode ser obtida através da avaliação da toxicidade em organismos típicos de solo (DORN, et al., 1998). Embora estudos de toxicidade da trifluralina com animais de solo, sejam ainda raros, este herbicida tem se mostrado bem agressivo quando testado em organismos terrestres. Estudos com o artrópode terrestre *Porcellio scaber* demonstraram que o animal acumulou o herbicida trifluralina em seus metabólitos, porém com uma taxa de toxicidade inferior quando comparado com minhocas; os autores comentam que isto se deve ao íntimo contato que esta possui com o solo e a maior permeabilidade de sua cutícula (STAAK et al., 1998). Segundo o trabalho realizado por Dorn et al. (1998), as minhocas, por estarem em íntimo contato com o solo, possuem uma sensibilidade maior a produtos químicos quando comparadas a testes feitos com microrganismos e plantas.

2.3. A ação da trifluralina no solo

Durante a utilização dos agrotóxicos, algumas contaminações podem ocorrer, principalmente a contaminação da água e do solo. A maioria destes produtos químicos entra em contato com o solo por aplicação direta, ou por processos de deriva durante sua aplicação sobre as plantas, ou ainda pela incorporação destas plantas no solo após sua morte, sendo assim é importante conhecer os fenômenos que ocorrem com esses pesticidas no ambiente (TAVARES et al., 1996).

Os agrotóxicos são muitas vezes adsorvidos pelas partículas do solo durante o processo de degradação biótica ou abiótica. O solo apresenta diferentes tipos de microflora, e esta é que determina o tipo de biodegradação que ocorre. Os impactos que os agrotóxicos podem ocasionar sobre a biota do solo podem variar de acordo com suas características físicas e também se deve ao tipo de microflora existente no habitat. A estrutura molecular, a intensidade de aplicação, as características físicas e microbiológicas do solo, além das vias de degradação podem determinar o tempo de permanência de compostos químicos no solo (GRISOLIA, 2005).

O comportamento dos herbicidas no solo pode ser influenciado por processos relacionados à composição e degradação desse herbicida pelas partículas do solo (TAVARES et al., 1996).

A trifluralina é um herbicida pré-emergente, foi incorporado no uso agrícola desde o início dos anos 1960, sendo moderadamente persistente no solo (BELLINASSO et al., 2003).

Este herbicida pode ser inativado por volatilização, fotodecomposição e por processos químicos e biológicos, se torna líquido a temperaturas em torno de 48,5 a 49°C. É muito solúvel em solventes orgânicos como metanol, acetona, xileno e clorofórmio. A solubilidade em água é inferior a 1 p.p.m à 27°C, seu ponto de ebulição é obtido por volta de 96-97°C, sendo suscetível a decomposição pela radiação ultravioleta (PROBST et al., 2002).

Bactérias isoladas de solos brasileiros contaminados com trifluralina são capazes de degradar a substância, podendo, portanto, ser utilizadas para estudar a biologia molecular e bioquímica da degradação da trifluralina (BELLINASSO et al., 2003).

A trifluralina é intensamente adsorvida pelos colóides de matéria orgânica e muito pouco pelos da argila; em solos, nos quais a matéria orgânica é o principal composto, há um impedimento para a absorção do produto pelas raízes das plantas, neste caso não é recomendado seu uso; a lixiviação do herbicida é muito reduzida assim como o movimento lateral no solo (RODRIGUÊS; ALMEIDA, 1998). Sua persistência média no solo é de 1,8 p.p.m. de resíduo 180 dias após sua aplicação. Em alimentos sua tolerância é de 0,05 p.p.m.

A degradação do herbicida trifluralina pode ser por via química, microbiana ou fotólise; na degradação química ocorre dealquilação do grupo amino, redução do grupo nitro e amino, oxidação parcial do grupo trifluorometil a carboxi e subsequente degradação a fragmentos menores; já a microbiana ocorre, principalmente em condições anaeróbicas, onde foi constatado 98% de degradação do produto, já em condições aeróbicas foi obtido 25% de degradação (RODRIGUÊS; ALMEIDA, 1998). Variações sazonais podem influenciar de modo positivo para ambas as formas de degradação agirem simultaneamente.

Segundo o estudo realizado por Tavares et al. (1996) foi verificado que a trifluralina é mais fortemente adsorvida no ácido húmico do que no solo, além de ser constatado que quando esta é adsorvida na superfície do ácido húmico dificilmente será lixiviada para camadas inferiores, havendo desta maneira uma diminuição de sua mobilidade.

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste projeto são:

- 3.1. Expor exemplares de *R. padbergi* a substratos contendo o herbicida trifluralina em diferentes concentrações, por períodos de sete e 90 dias de exposição. Foram analisadas conjuntamente a sobrevivência e o comportamento dos animais;
- 3.2. Analisar histologicamente, após cada período de exposição, o intestino médio desses animais a fim de se verificar possíveis alterações morfológicas;
- 3.3 Realizar testes histoquímicos para a detecção de proteínas, lipídios, cálcio e carboidratos com o intuito de observar possíveis alterações na síntese de algum elemento, que posteriormente, poderiam indicar determinadas alterações fisiológicas;
- 3.4. Verificar a eficiência do uso destes animais em ensaios de biomonitoramento de agrotóxicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Material biológico

Espécimens de *R. padbergi* foram coletados manualmente em Rio Claro, SP e trazidos ao laboratório onde foram aclimatados a aproximadamente 21°C. Durante um período de 15 dias, os animais foram mantidos em terra coletada no local de coleta. O grupo de pesquisa vem mantendo uma criação destes animais em laboratório.

4.1.2 Montagem de Bioensaios

Foram montados cinco bioensaios contendo terra proveniente do local de coleta dos animais (grupo controle) e a mesma terra misturada ao herbicida trifluralina em diferentes concentrações (concentração indicada para uso agrícola, sendo a dose recomendada pelo fabricante de 0,0534 g/m², o dobro, a metade e um quarto desta dose). Assim, denominaremos os bioensaios do seguinte modo:

Bioensaio controle: animais mantidos em solo do local de coleta (2,5kg – solo controle).

Bioensaio um quarto: solo controle + 0,00178 g de trifluralina.

Bioensaio metade: solo controle + 0,00356 g de trifluralina.

Bioensaio campo: solo controle + 0,00712 g de trifluralina.

Bioensaio dobro: solo controle + 0,01424 g de trifluralina.

A quantidade de herbicida utilizada foi calculada para 2,5k g de solo, sendo esta a quantidade utilizada em cada bioensaio.

As devidas concentrações foram utilizadas por permitirem uma ampla visão do que acontece com o herbicida em diferentes situações. Em cada bioensaio preparado foram expostos 15 animais, os quais foram monitorados diariamente e alimentados com discos de batata inglesa, uma vez que a exposição subcrônica demora 90 dias para ocorrer. A exposição de sete dias teve a finalidade de analisar a resposta aguda.

4.2. Métodos

Após cada período de exposição, os animais foram anestesiados com éter etílico e dissecados a fim de se retirar o intestino médio que foi fixado em diferentes soluções, para que distintas técnicas pudessem ser aplicadas. Após a fixação, o material foi colocado em solução tampão fosfato de sódio pH=7, durante 24 horas e mantido na geladeira.

4.2.1 Histologia

O material foi desidratado em soluções de etanol 70, 80, 90 e 95%, durante 30 minutos cada banho. Posteriormente, foi transferido para uma solução de resina (JB-4- Polaron Instruments/ BIO RAD) e deixado na geladeira por 24 horas.

O material foi então colocado em moldes previamente preenchidos com resina contendo catalisador.

Depois de polimerizados, os blocos foram cortados com o auxílio de micrótomo Leica RM 2245; os cortes foram hidratados e recolhidos em lâminas. Após secagem, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, conforme rotina histológica, para posterior análise, observação e documentação.

4.2.2 Histoquímica

Os testes histoquímicos foram utilizados para detectar os seguintes elementos:

A. Proteínas totais

- Técnica do azul de bromofenol (segundo PEARSE, 1985).

Fixação do material em solução aquosa de Bouin por aproximadamente 24 horas; coloração pela solução de azul de bromofenol à temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas; lavagem dos cortes em água e banho em ácido acético por 5 minutos.

B. Polissacarídeos Neutros

-Técnica do PAS-Ácido Reativo de Schiff (segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Fixação em solução aquosa de Bouin; oxidação por 30 minutos em ácido periódico 1%; exposição ao reativo de Schiff por aproximadamente 1 hora no escuro; passagem em água sulfurosa por 9 minutos; lavagem por 30 minutos em água corrente.

C. Cálcio

- Método de von Kossa (segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Fixação em solução aquosa de Bouin por aproximadamente 24 horas; imersão dos cortes em nitrato de prata por 20 minutos; lavagem em água e transferência dos cortes para hidroquinona ou revelador; imersão em tiosulfato de sódio ou fixador F-5 por 5 minutos; contracoloração dos núcleos com hematoxilina.

D. Lipídios

- Método de sudan black B (segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Fixação do material em formol cálcio; coloração em sudan black B por 30 minutos; lavagem em água e montagem das lâminas em glicerina gélica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Biomonitoramento

A análise comportamental revelou que os diplópodos não rejeitaram o solo contaminado com o herbicida trifluralina. Durante o período de exposição, os animais foram observados enterrados e revolvendo o solo enquanto se alimentavam.

Durante o período total de exposição (90 dias), o número de animais do bioensaio controle permaneceu estável até a 5ª semana, com apenas uma morte neste período. No bioensaio campo, a estabilidade se manteve até a 8ª semana e no bioensaio dobro até a 7ª semana; os três bioensaios chegaram a 12ª semana com a mesma taxa de sobrevivência. Tanto no bioensaio um quarto quanto no bioensaio metade, a estabilidade se manteve até 4ª semana; os indivíduos do bioensaio um quarto sobreviveram até 88º dia e o bioensaio metade até o 89º dia.

Os animais presentes no bioensaio um quarto e metade apresentaram sobrevivência até a última semana de exposição, no entanto, não chegaram a completar os 90 dias de exposição, isto se deve provavelmente, por estas concentrações apresentarem baixa quantidade de herbicida, podendo ser chamadas de concentrações residuais; assim, os animais continuaram se alimentando de compostos presentes no solo, não conseguindo perceber a toxicidade do agente químico.

Por outro lado, indivíduos presentes no bioensaio dobro e campo conseguiram sobreviver até o fim do experimento, essas por serem as maiores concentrações, apresentavam maior grau de toxicidade, provavelmente os animais ao perceberem tal toxicidade deixaram de se alimentar do solo ou diminuíram o revolvimento do mesmo e passaram a se alimentar somente da batata, utilizada como alimento nos bioensaios. Além de estratégias comportamentais utilizadas pelos animais quando submetidos a agentes estressores, os organismos de uma mesma espécie, não respondem igualmente à exposição à xenobióticos, devido ao polimorfismo genético presente em uma população (NASCIMENTO et al., 2008).

5.2. Análise do intestino médio

Os resultados serão apresentados na forma de artigo científico que será enviado para publicação em revista especializada.

TOXICIDADE DO HERBICIDA TRIFLURALINA: ALTERAÇÕES HISTOPATÓLOGICAS E HISTOQUÍMICAS NO INTESTINO MÉDIO DE DIPLÓPODOS

Vanessa Vanderléia Merlini ¹, Larissa Rosa Nogarol ¹, Carmem Silvia Fontanetti ^{1*}

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24A, nº 1515, CEP 13506-900, Bela Vista, Rio Claro, SP, Brasil.

*fontanet@rc.unesp.br (autor correspondente)

Resumo

Atualmente o uso de agroquímicos atinge o mundo todo e muitas vezes a sua utilização é feita de modo abusivo, indiscriminado e por longos períodos. Várias pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de verificar a presença e o efeito de resíduos de agrotóxicos na natureza, cujos resultados são preocupantes. Dentre os agroquímicos mais utilizados, estão os herbicidas e, dentre estes, a trifluralina tem ocupado um dos lugares mais representativo. Este herbicida possui alta persistência no solo como consequência da sua baixa mobilidade, podendo desta maneira afetar a fauna edáfica. Os diplópodos compreendem um grupo de invertebrados importantes na dinâmica do solo; por possuírem um íntimo contato com o mesmo, estes animais podem ser utilizados como bioindicadores na toxicidade de substratos. Neste sentido, foi objetivo deste trabalho utilizar o diplópodo *Rhinocricus padbergi* como organismo teste para verificar possíveis efeitos tóxicos do herbicida trifluralina. Para a análise da toxicidade foi utilizada as análises histológica e histoquímica do intestino médio do animal, local onde ocorre a digestão. Foram montados cinco bioensaios contendo terra proveniente do local de coleta dos animais (grupo controle) e a mesma terra misturada ao herbicida trifluralina em diferentes concentrações (concentração indicada para uso agrícola, sendo a dose recomendada pelo fabricante de 0,0534 g/m², o dobro, a metade e um quarto desta dose), os animais foram expostos por 7 e 90 dias (exposição aguda e subcrônica respectivamente). Os indivíduos do grupo controle não apresentaram alterações em nenhuma das exposições. Na exposição aguda (7dias), observou-se que os animais dos grupos ¼ e metade apresentaram um acúmulo de grânulos citoplasmáticos na camada de células hepáticas, constituinte do intestino médio; já o grupo campo apresentou como principal alteração, aumento na taxa de renovação epitelial e o grupo dobro um aumento na liberação

de vesículas de secreção com conteúdo protéico. Os animais pertencentes aos grupos $\frac{1}{4}$ e metade não sobreviveram até o final do experimento. Desta forma a resposta subcrônica (90 dias) foi obtida com os grupos campo e dobro. Observou-se que tanto o grupo campo quanto o grupo dobro apresentaram uma desestruturação do epitélio e uma maior ocorrência de hemócitos por entre a camada de células hepáticas, tanto isolados quanto agrupados, os quais reagiram positivamente a técnica de detecção de proteínas; além disso, o grupo dobro apresentou ocorrência de pontos de vacuolização nas células principais e dilatação do espaço intercelular, pontos de renovação epitelial com liberação de células para o lúmen e aumento de vesículas de secreção lançadas ao lúmen. Diante do exposto, os resultados aqui observados alertam para um cuidado na utilização deste herbicida, já que este promoveu alterações significativas nas células do intestino médio do organismo-teste empregado.

Palavras-chave: milípede; agrotóxico; ecotoxicidade; histologia; histoquímica.

1. Introdução

Atualmente o uso de agroquímicos é realizado pelo mundo todo, sendo muitas vezes utilizado por longos períodos e de modo indiscriminado, levando a uma série de contaminações ambientais. O Brasil possui uma grande diversidade biológica, na qual existem ecossistemas únicos e muito sensíveis, os quais muitas vezes estão sujeitos a contaminação ambiental proveniente da utilização abusiva de agrotóxicos (UETA et al., 1998).

A agricultura convencional, a qual faz uso de produtos químicos como herbicidas, tem afetado diretamente os ecossistemas, provocando problemas fisiológicos e hormonais que alteram o ciclo reprodutivo de diferentes espécies, por exemplo, o de insetos e aves, além de ocasionar a mortalidade de peixes, aves e mamíferos silvestres (GRISOLIA, 2005).

O Brasil é o 5º maior consumidor de pesticidas, sendo que os herbicidas representam a maior parcela tanto no Brasil quanto no mundo. Segundo Ueta et al. (1998) apenas 0,1% dos produtos químicos atingem o seu alvo específico, 99,9% da aplicação tem outros destinos, como solo, águas residuais e subterrâneas e organismos não alvo.

A procura pelo conhecimento dos efeitos tóxicos dos agrotóxicos tem grande importância, principalmente por que o homem pode ser exposto a esses produtos químicos durante sua manipulação e aplicação, além de sua presença no ambiente ou de seus resíduos em culturas, podendo provocar efeitos nocivos à saúde (KOTAKA; ZAMBRONE, 2001).

Um dos herbicidas mais empregados no Brasil é a trifluralina, pertencente a família das dinitroanilinas, que tem dentre suas principais características, a alta persistência no solo devido a sua baixa mobilidade, o que pode provocar maiores danos às culturas (CALDERON et al., 1999). Além dos danos provocados às plantas, este herbicida pode provocar impactos negativos sobre a fauna edáfica, tendo em vista que este produto é lançado diretamente ao solo durante sua aplicação, sendo adsorvido pelas partículas que o compõem.

O uso da trifluralina no mundo, por ano, pode chegar a 12 milhões de toneladas; em termos de toxicidade é considerada de moderada a altamente tóxica aos organismos aquáticos (KLUPINSKI, 2003). Tal problemática tem gerado preocupações, assim, estudos de avaliação toxicológica são muito importantes, uma vez que podem identificar contaminações ambientais, bem como servir como um alerta à população, principalmente aos trabalhadores agrícolas que fazem uso regular de produtos desta natureza.

Neste sentido, os diplópodos vêm se tornando uma promissora fonte de pesquisa, pois são animais da fauna edáfica, cujo comportamento favorece a incorporação de produtos presentes no solo por eles habitado (TRIEBSKORN, et al., 1991; KÖHLER; TRIEBKORN, 1998; NOGAROL; FONTANETTI, 2010; NOGAROL; FONTANETTI, 2011; GODOY; FONTANETTI, 2010; PEREZ; FONTANETTI, 2011a; SOUZA; FONTANETTI, 2011).

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial tóxico da trifluralina utilizando o diplópodo *Rhinocricus padbergi* como organismo teste, em exposição aguda e subcrônica a diferentes concentrações do produto; estudos histológico e histoquímico do intestino médio dos animais foram utilizados como biomarcadores, uma vez que este é o local onde ocorre a digestão e absorção de substâncias.

2. Materiais e Métodos

2.1 Substância testada

A trifluralina é um herbicida seletivo pré emergente, pertencente a família das dinitroanilinas (α,α,α -trifluorometil-2,6-dinitro-N,N-dipropil-p-toluidina), faz parte do grupo C, possivelmente carcinogênico em humanos, considerado altamente tóxico (classe toxicológica II) e muito perigoso quanto ao seu potencial de periculosidade ambiental, estabelecido pela Portaria Normativa n. 139 de 21 de dezembro de 1994 do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), com base no decreto n. 98.816/90. Foi utilizado o produto comercial Trifluralina Nortox®; esta é apresentada sob

forma líquida como concentrado emulsionável, utilizada no controle de plantas daninhas de ciclo anual, principalmente gramíneas.

2.2. Material biológico

Os espécimens adultos utilizados de *R. padbergi* (peso médio $\pm$ DP = 1,38g $\pm$ 1,05; comprimento médio $\pm$ DP= 5,15cm $\pm$ 1,69), foram pesados e medidos com a finalidade de evitar diferenças intra-específicas. Os indivíduos foram coletados manualmente na Universidade Estadual Paulista (UNESP) campus de Rio Claro/SP (22° 24'36''S; 47°33'36''W), Brasil e trazidos ao laboratório, onde foram aclimatados a temperatura de aproximadamente $\pm$ 21°C e ciclo claro-escuro de 12 horas. Durante um período de 15 dias, os animais foram mantidos em terra oriunda do local de coleta e alimentados com tubérculo de batata.

2.3. Montagem de Bioensaios

Foram montados cinco bioensaios contendo terra proveniente do local de coleta dos animais (grupo controle) e a mesma terra misturada ao herbicida trifluralina em diferentes concentrações (concentração indicada para uso agrícola, sendo a dose recomendada pelo fabricante de 0,0534 g/m², o dobro, a metade e um quarto desta dose). Assim, denominaremos os bioensaios do seguinte modo:

Bioensaio controle: animais mantidos em solo do local de coleta (2,5 kg – solo controle).

Bioensaio um quarto: solo controle + 0,00178 g de trifluralina.

Bioensaio metade: solo controle + 0,00356 g de trifluralina.

Bioensaio campo: solo controle + 0,00712 g de trifluralina.

Bioensaio dobro: solo controle + 0,01424 g de trifluralina.

A quantidade de herbicida utilizada foi calculada para 2,5 kg de solo, sendo esta a quantidade utilizada em cada bioensaio.

As devidas concentrações foram utilizadas por permitirem uma ampla visão do que acontece com o herbicida em diferentes situações. Em cada bioensaio preparado foram expostos 15 animais, os quais foram monitorados diariamente e alimentados com discos de batata inglesa (em média um disco de tubérculo a cada duas semanas). Os períodos de

exposição de 7 e 90 dias tiveram como objetivo, analisar as respostas aguda e subcrônica, respectivamente.

2.4 Análises do solo

Amostras do solo utilizado na montagem dos bioensaios foram coletadas segundo orientações específicas (instruções de coleta de solo fornecidas pelo Departamento de Ciência do Solo/ESALQ/USP) e encaminhadas ao Departamento de Ciência do solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ, USP, Piracicaba, SP, Brasil. No laboratório, as amostras foram submetidas à análise granulométrica, medição de pH em meio aquoso e quantificação de matéria orgânica. A metodologia utilizada pelo laboratório para análise granulométrica do solo foi Bouyoucos (densímetro) (DANE; TOPP, 2002); a análise do pH foi realizada em meio aquoso e a matéria orgânica através do método dicromato/titulométrico.

2.5. Histologia e histoquímica

Após cada período de exposição, três animais foram anestesiados com éter etílico e dissecados a fim de se retirar o intestino médio que foi fixado em solução aquosa de Bouin, paraformaldeído e formol cálcio 4%, para que distintas técnicas pudessem ser aplicadas. Após a fixação, o material foi colocado em solução tampão fosfato de sódio pH=7, durante 24 horas e mantido na geladeira. Posteriormente o material foi desidratado em soluções de etanol 70, 80, 90 e 95%, durante 30 minutos cada banho. Logo em seguida, foi transferido para uma solução de resina de embebição Leica e deixado na geladeira por 24 horas.

O material foi então colocado em moldes previamente preenchidos com resina contendo catalisador. Secções de 6 µm de espessura foram obtidas com auxílio de micrótomo Leica RM 2245, os cortes foram hidratados e recolhidos em lâminas. Após secagem, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), conforme rotina histológica e submetidas a testes histoquímicos; depois de secas foram montadas com bálsamo do Canadá e após secagem foram observadas e fotografadas em fotomicroscópio Leica DFC 280 e software Q-WIN.

Os testes histoquímicos aplicados foram os seguintes: azul de bromofenol para detecção de proteínas (segundo PEARSE, 1985), (ácido periódico-Schiff) PAS para detecção de polissacarídeos neutros (segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983), método de von Kossa

para cálcio (segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) e sudan Black B para lipídios (segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

3. Resultados

3.1 Análise do solo

A análise de solo empregada no presente trabalho se fez necessária para a caracterização do mesmo e desta forma foi possível calcular a quantidade de herbicida utilizada no bioensaio, já que a quantidade de produto utilizada para aplicação no campo difere dependendo das características do solo; portanto os cálculos foram realizados para um solo argiloso, sendo este caracterizado através de análise granulométrica.

O solo utilizado na montagem nos bioensaios, coletado no local de ocorrência dos animais foi caracterizado como argiloso ácido (pH =5,5) e com conteúdo de matéria orgânica igual a 1gMO/Kg de solo analisado (Tabela 1).

3.1. Grupo controle

Os animais do grupo controle dos períodos de 7 e 90 dias, apresentaram integridade em todos os constituintes do intestino médio, conforme descrito por Fantazzini et al. (2002); é constituído por um epitélio pseudoestratificado com bordo em escova, seguido de camada muscular, uma camada de células hepáticas; anteriormente denominada de camada de "corpo gorduroso" do intestino médio, este novo termo foi proposto devido a sua similaridade com as células do hepatopâncreas de alguns invertebrados e seu atuante papel em processos de detoxicação, além de ser revestido por uma membrana externa (Fig. 1A). O epitélio é constituído por células absorptivas, também chamadas de principais, dotadas de um bordo em escova evidente (cabeças de seta nas Figs. 1A e D), células regenerativas (Fig. 1D) e por células secretoras. As células da camada de células hepáticas, apresentam diferentes formas, núcleos esféricos e citoplasma heterogêneo (Fig. 1B), onde são observados vários grânulos de diferentes aspectos (setas na Fig. 1B). Na camada de células hepáticas podem ser observados hemócitos (Fig. 1A). Foram observadas poucas vesículas de secreção de liberação do tipo apócrina (Fig. 1C), além de eventuais pontos de renovação epitelial (* na Fig. 1D).

As análises histoquímicas também seguiram o padrão descrito para a espécie. A presença de proteínas pôde ser observada nas células principais, na camada de células hepáticas e na camada muscular (Fig. 2A). Os polissacarídeos neutros foram observados na membrana basal, na camada de células hepáticas e no bordo em escova (Fig. 2B). O cálcio pôde ser observado nas células principais e nos grânulos citoplasmáticos distribuídos pela camada de células hepáticas (setas na Fig. 2C). Lipídios não foram detectados nos constituintes do intestino médio dos animais analisados.

3.2. Exposição aguda

Os animais expostos por 7 dias dos grupos $\frac{1}{4}$ e metade apresentaram um acúmulo de grânulos citoplasmáticos na camada de células hepáticas (setas na Fig. 3A). Animais expostos a concentração campo apresentaram pontos de evidência de renovação epitelial, dada a altura das células epiteliais, sendo observado que determinadas regiões epiteliais apresentavam células mais baixas em relação às demais, indicando que neste local, as células foram eliminadas e outras estavam surgindo (* na Fig. 3B).

O grupo dobro apresentou um aumento na liberação de vesículas de secreção do tipo apócrina (Fig. 3C). Por meio da aplicação das técnicas de azul de bromofenol (Figs. 5A e B) e PAS (Fig. 5D), verificou-se o conteúdo protéico das vesículas. Alguns dos grânulos citoplasmáticos presentes na camada de células hepáticas mostraram-se positivos ao cálcio (Fig. 5F).

Os resultados aqui encontrados estão resumidos na Tabela 2.

3.3. Exposição subcrônica

Os animais dos grupos $\frac{1}{4}$ e metade morreram antes do período de 90 dias inicialmente proposto para análise da resposta subcrônica de exposição. Desta maneira, as análises morfológica e histoquímica do intestino médio foram realizadas apenas para os animais expostos as concentrações campo e dobro.

Tanto os animais do grupo dobro quanto os do grupo campo apresentaram desestruturação do epitélio (Figs. 4A e E) e um aumento na ocorrência de hemócitos tanto isolados quanto agrupados na camada de células hepáticas, sendo mais evidente no grupo dobro (Figs. 4E e F).

Os animais pertencentes ao grupo dobro apresentaram pontos de vacuolização por entre as células principais e dilatação do espaço intercelular (cabeças de setas na Fig. 4C); além disso, ocorreu intensa renovação epitelial com liberação de células para o lúmen (setas nas Figs. 4B, C e D).

A análise histoquímica mostrou por meio da aplicação das técnicas de azul de bromofenol (Fig. 5A) e PAS (Fig. 5E) que o conteúdo das vesículas de secreção observadas nos indivíduos expostos a concentração dobro possuíam conteúdo protéico, não sendo observado nem cálcio nem polissacarídeos neutros nas mesmas. Os hemócitos reagiram positivamente a técnica de detecção de proteínas (Fig. 5C). Não foram detectadas alterações referentes ao conteúdo lipídico nos constituintes do intestino médio dos animais analisados.

Os resultados aqui encontrados estão resumidos na Tabela 2.

4. Discussão

Os agrotóxicos constituem uma das principais classes de poluentes químicos em todo o mundo, sendo responsáveis pela contaminação da atmosfera, água e solo, além de causar impactos ambientais (GRISOLIA, 2005); isto pode ocorrer através da aplicação direta destes produtos ou quando são incorporados ao solo durante a aplicação sobre as plantas (TAVARES et al., 1996). Desta maneira, a fauna edáfica acaba sendo consideravelmente prejudicada pela contaminação do solo, pois sofre a ação tóxica desses agentes químicos por habitarem e se alimentarem de matéria orgânica presente no substrato.

Nesse sentido, alterações podem ocorrer tanto no comportamento quanto na própria sobrevivência desses animais. Algumas espécies de milípedes preferem morrer, a se alimentarem com produtos contaminados com substâncias tóxicas (HOPKIN; READ, 1992). No entanto, no presente estudo foi observado que todos os indivíduos, expostos a diferentes concentrações de trifluralina, conseguiram revolver o substrato, se alimentando da matéria orgânica presente no solo e, conseqüentemente, ingerindo trifluralina adsorvida nas partículas do mesmo.

Os invertebrados terrestres, geralmente possuem o epitélio do sistema digestório formado por apenas uma camada de células; estas por sua vez atuam como uma barreira entre o ambiente interno do animal e o alimento presente no lúmen intestinal. Entretanto, nem sempre esta barreira é eficiente, uma vez que, em algumas espécies de diplópodos, o epitélio intestinal pode permitir a passagem de substâncias tóxicas do lúmen para outros tecidos do corpo do animal (HOPKIN et al., 1985), o que evidencia possíveis falhas das barreiras

biológicas. No presente trabalho foi observado por meio das análises histológica e histoquímica, alterações no intestino médio dos indivíduos expostos a diferentes tratamentos com o herbicida trifluralina.

As alterações tissulares mais proeminentes encontradas neste estudo foram: acúmulo de grânulos citoplasmáticos na camada de células hepáticas, maior ocorrência de vesículas de secreção, indicativos de aumento da renovação epitelial, vacuolização das células epiteliais com dilatação do espaço intercelular, desestruturação do epitélio e aumento na presença de hemócitos.

No intestino médio de diplópodos, a camada de células hepáticas trabalha ativamente no processo de detoxicação do organismo, quando este é agredido por substâncias tóxicas (KÖHLER et al., 2002). Este processo pôde ser verificado pelo aumento na presença de grânulos citoplasmáticos nos indivíduos expostos ao herbicida durante a exposição aguda, sendo observado um acúmulo progressivo destes conforme aumentava a concentração do herbicida.

O acúmulo de minerais na forma de esferocristais é um importante mecanismo na manutenção da homeostase do organismo desses animais, promovendo um equilíbrio iônico, que envolve a reciclagem, armazenamento e excreção de minerais (FONTANETTI et al., 2006; PEREZ; FONTANETTI, 2011a). Além disso, mantém os minerais em excesso em uma forma inerte, evitando o comprometimento de todo o organismo.

Através da técnica de von Kossa pode-se detectar que a maioria dos grânulos citoplasmáticos observados na camada de células hepáticas apresenta cálcio em sua constituição; a formação destes grânulos de cálcio se deve provavelmente, pela alteração que a trifluralina provoca na permeabilidade das membranas celulares. A ação do herbicida provoca colapso no potencial elétrico das membranas, acarretando em um efluxo de Ca^{2+} do interior das mitocôndrias e a entrada de Ca^{2+} do exterior para o interior da célula por meio das proteínas uniportadoras, aumentando desta maneira, as concentrações desse íon no interior do citoplasma (ARGESE et al., 2002).

Diplópodos expostos a lodo de esgoto, tanto doméstico quanto industrial, também apresentaram acúmulo de grânulos no citoplasma das células constituintes do intestino médio (PEREZ; FONTANETTI, 2011a, GODOY; FONTANETTI, 2010, NOGAROL; FONTANETTI, 2010). O lodo é composto por uma grande variedade de substâncias orgânicas, inorgânicas, patógenos e metais e embora no presente estudo a molécula empregada seja orgânica, ambas provocaram a mesma resposta de detoxicação no animal.

O aumento da liberação de vesículas de secreção de conteúdo protéico foi também observado como resposta da exposição ao herbicida. Segundo Nogarol e Fontanetti (2010), as vesículas de secreção desempenham o importante papel de proteger o tecido contra a entrada de substâncias tóxicas, além de possuir a função de eliminar agentes tóxicos previamente absorvidos; as autoras encontraram vesículas com teor glicoprotéico com predominância protéica. Desta maneira, as vesículas além de proteger o epitélio também agem na eliminação de substâncias. Assim, é possível que estas representem um mecanismo de eliminação de substâncias via epitélio.

Outros grupos de invertebrados também exibiram respostas similares quando expostos a diferentes agente tóxicos. Lesmas e planárias, por exemplo, apresentaram como estratégia de defesa o aumento na produção de muco após exposição a diferentes agentes químicos (TRIEBSKORN et al., 1991). Essa resposta também pode ocorrer quando organismos são expostos a pesticidas e metais pesados (TRIEBSKORN et al., 1998).

A regeneração dos constituintes epiteliais é um processo fisiológico normal, o epitélio pode ser eliminado e substituído por um novo, isto se deve ao crescimento e divisão celular das células regenerativas (HOPIKN; READ, 1992). Entretanto, as células do epitélio expostas a poluentes estão sujeitas a alterações que podem resultar na maior taxa de morte e consequente renovação das mesmas, o que representa uma tentativa do organismo do animal compensar o dano sofrido após a ingestão de solo contaminado (SOUZA; FONTANETTI, 2011).

O aumento de regiões epiteliais com indicativo de renovação indica que houve lesão tecidual com provável substituição de células danificadas por novas a fim de manter a funcionalidade do tecido. Porém, as células regenerativas não conseguiram acompanhar na mesma velocidade a reposição de células perdidas, sendo assim, começam a ser afetadas negativamente de forma progressiva até chegar na desestruturação ou perda total do epitélio na tentativa de reverter o processo tóxico provocado pelo herbicida ou excretar os produtos durante a sua substituição (HUBERT, 1979).

A vacuolização citoplasmática e a dilatação do espaço intercelular observadas nas células epiteliais dos animais expostos ao herbicida trifluralina, também foi uma das respostas observada em espécimens expostos a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (SOUZA; FONTANETTI, 2011).

O processo de vacuolização é uma das principais características de células necróticas, ou seja, células que sofreram estresse severo como a exposição a um agente tóxico (MELLO; CASTILHO, 2007). Células necróticas também encontram-se sujeitas a alterações na

membrana plasmática que levam a perda das suas funções e posterior ruptura. Segundo Kumar et al. (1994) a dilatação do espaço intercelular provoca uma mudança na membrana plasmática, isto se deve à presença de células necróticas, ocasionando assim, uma desestabilização nas junções.

O aumento da presença de hemócitos também tem sido relatado como uma resposta bastante freqüente de invertebrados após exposição a agentes tóxicos de diferentes naturezas. Segundo Perez e Fontanetti (2011b), os hemócitos desempenham um importante papel no reconhecimento de materiais estranhos para o organismo de invertebrados, podendo mediar e efetuar a defesa celular. Godoy e Fontanetti (2010), Nogarol e Fontanetti (2010) e Perez e Fontanetti (2011a) também relataram essa resposta em diplópodos expostos a lodo de esgoto. Após exposição crônica a poluentes orgânicos e metais, o bivalve estuarino *Mytella falcata* também apresentou aumento no número de hemócitos no vaso de hemolinfa, chegando a deformar o filamento branquial (DAVID et al., 2008).

Neste sentido, a grande ocorrência de hemócitos indicou a presença de lesões no intestino médio devido à ação tóxica da trifluralina, o que levou ao desenvolvimento de um processo inflamatório. Desta forma, essas células atuaram na defesa do organismo, aumentando a sua população na camada de “corpo gorduroso” a fim de promover a eliminação das toxinas ali presentes. Segundo David et al. (2008), essa resposta também pode estar relacionada a processos de renovação epitelial através da reabsorção do epitélio danificado.

Os animais expostos a concentração um quarto e metade da exposição aguda apresentaram como resposta tissular, o acúmulo de grânulos citoplasmáticos, sem lesão tecidual, isto se deve possivelmente às baixas concentrações de herbicida utilizadas, sendo assim, o processo de detoxicação foi eficiente, promovendo a homeostase do organismo sem a ação de outros mecanismos. No entanto, os animais expostos a concentração campo e dobro da mesma exposição necessitaram de mecanismos adicionais como aumento de hemócitos, da renovação epitelial e de vesículas de secreção, para tentar manter a homeostase do organismo.

Já os animais expostos por 90 dias desencadearam progressivamente mecanismos de defesa conforme ocorriam os avanços dos danos: vacuolização e dilatação do espaço intercelular, intensa renovação epitelial com liberação de células para o lúmen e desestruturação ou perda total do epitélio, acometendo todo o funcionamento do epitélio intestinal, isto se deve à ação tóxica do herbicida trifluralina, provavelmente se a exposição continuasse por mais tempo os animais morreriam em decorrência dos danos causados.

Diante do exposto, foi possível constatar que concentrações maiores provocaram alterações tissulares mais prejudiciais aos animais, isto também pode ser observado nos trabalhos desenvolvidos com a mesma espécie com lodo de esgoto e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (NOGAROL; FONTANETTI, 2010, SOUZA; FONTANETTI, 2011).

As respostas aqui encontradas reportam para um alerta na utilização deste herbicida, uma vez que este provocou alterações mesmo em doses residuais (um quarto e metade), levando a morte desses indivíduos e alterações significativas em doses recomendadas pelos fabricantes (campo), principalmente se o uso for prolongado.

O cuidado com o uso deste produto se faz necessário, portanto, devem-se seguir as instruções fornecidas pelos fabricantes, além de não fazer o uso indiscriminado e por longo período do produto o que ocasionaria sérios problemas ambientais, como desequilíbrios populacionais de invertebrados terrestres indispensáveis para a manutenção do solo.

Agradecimentos

As autoras agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) processo nº 2010/09588-2 pelo apoio financeiro, Cristiane M. Miléo pelas ilustrações, Gerson Mello Souza pelo suporte técnico, Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales por fornecer o produto comercial Trifluralina Nortox®, Dr. André Arnosti pela ajuda com os cálculos das concentrações do herbicida, biólogo Raphael Bastão de Souza, Profa. Cintya Aparecida Christofolletti e Dra. Thaís Cristina Casimiro Fernandes pela ajuda com os experimentos.

Referências Bibliográficas

- ARGESE, E., BETTIOL, C., FASOLO, M., ZAMBON, A., AGNOLI, F. Substituted aniline interation with submitochondrial particles and quantitative struture-activity relationships. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1558, p. 151-160, 2002.
- CALDERÓN, M.J., HERMOSÍN, M.C., CORNEJO, J. y MORENO, F. **Movilidad de trifluralina en laboreo tradicional y de conservación**. Estudios de la Zona No Saturada del Suelo. Eds. R. Muñoz-Carpena, A. Ritter, C. Tascón: 1999. Tenerife, p.83-88.
- DANE, J.H.; TOPP, C. **Methods of Soil Analysis**. Part 4. Physical Methods (Soil Science Society of America Book Series. v.5, 2002.
- DAVID, J.A.O.; SALAROLI, R.B.; FONTANETTI, C.S. The significance of changes in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gill filaments chronically exposed polluted environments. **Micron**, v.39, p. 1293-1299, 2008.

FANTAZZINI, E.R.; FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Midgut of the millipede *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Diplopoda: Spirobolida): histology and histochemistry. **Arthropoda Selecta**, v.11, p.135-142, 2002.

FONTANETTI, C.S.; TIRITAN, B.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Mineralized bodies in the fat body of *Rhinocricus padbergi* (DIPLOPODA). **Braz. J. morphol. Sci.**, v.23, p. 487-493, 2006.

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

GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. 1ª ed. Brasília: editora ULBRA, 2005, 394p.

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

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

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.

JUNQUEIRA, L.C.U., JUNQUEIRA, M.M.S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo; Livraria Editora Santos, 1983, 123p.

KÖHLER, H.R.; TRIEBSKORN, R. Assessment of the cytotoxic impact of heavy metals on soil invertebrates using a protocol integrating qualitative and quantitative components. **Biomarkers**, v.3, n.2, p.109-127, 1998.

KÖHLER, H.R. Localization of metals in cells of saprophagous soil arthropods (Isopoda, Diplopoda, Collembola). **Microsc. Res. Tech.**, v. 56, p.393-401, 2002.

KOTAKA, E.T.; ZAMBRONI, F.A.D. **Contribuições para a construção de diretrizes de avaliação do risco toxicológico de agrotóxicos**. Campinas, SP ILSI, Brasil, 2001.

KLUPINSKI, T. P. Abiotic Degradation of Trifluralin by Fe(II): Kinetics and Transformations Pathways. **Environmental Science Technology**, v. 37, n. 7, p. 1311-1318, 2003.

KUMAR, V. COTRAN, R.S., ROBBINS, S.L.. **Patologia Básica**. 5ª Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1994, 608 p.

MELLO, M. L. S, & CASTILHO, R. F. Morte Celular. **A célula**. In: H. F. Carvalho, & S. M. Recco-Pimentel 2ª Ed, Barueri, SP: Manole. 2007. p. 364-373.

NOGAROL, L.R.; FONTANETTI, C.S. Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate contained sewage mud: Tissular responses of the midgut. **Micron**, v.41, p. 239-246, 2010.

NOGAROL, L.R.; FONTANETTI, C.S. Ultrastructural Alterations in the Midgut of Diplopods after Subchronic Exposure to Substrate Containing Sewage mud. Rev. **Water Air Soil Pollut**, v.218, p.539-547, 2011.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. 4^a ed. Edinburg: Churchill Livingstone, 1985, 1055 p.

PEREZ, D.G.; FONTANETTI, C.S. Assessment of the Toxic Potencial of Sewage Sludge in the midgut of the Diplopod *Rhinocricus pagbergi*. Rev. **Water air Soil Pollution**, v.128, p.437-444, 2011a.

PEREZ, D.G.; FONTANETTI, C.S. Hemocitical responses to environmental stress in invertebrates: a review. **Environmental monitoring and Assessment**, v.177, p.437-447, 2011b.

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

TAVARES, M.C.H.; LANDGRAF, M.D.; VIEIRA, E.M.; REZENDE, M.O.O. Estudo da adsorção-dessorção da trifluralina em solo e em ácido húmico. Ver. **Química Nova**. v.19, n.6, p.605-608, 1996.

TRIEBSKORN, R. KÖHLER, H.R.; ZANH, T.; VOGT, G. LUDWING, M.; RUMPF, S. KRATZMANN, M. ALBERTI, G.; STORCH, V. Invertebrate cells as targets for Hazardous substances ziet. **Fur angewandte Zool**. n. 78, p. 277-287, 1991.

TRIEBSKORN, R., CHRISTENSEN, K., HEIN, IGNAZ. Effects of orally and dermally applied metaldehyde on mucus cells of slugs (*Deroceras reticulatum*) depending on temperature and duration of exposure. **J. Moll. Stud**. v. 64, p. 467-487, 1998.

UETA, J.; PEREIRA, N.L.; SHUHAMA, I.K.; CERDEIRA, A.L. Biodegradação de herbicidas e Biorremediação. Microrganismos degradadores do herbicida atrazina. **Biotechnology**, Madri, v. 1, p. 10-13, 1998.

Tabelas

Tabela 1: Resultados da análise de solo

pH aquoso	Matéria Orgânica g/Kg	Carbono orgânico g/Kg	Análise Granulométrica	
			Argilas g/Kg	Classe de textura
5,5	1	1	352	Argila

Tabela 2: Alterações morfológicas observadas no intestino médio do diplópodo *R. padbergi* exposto por 7 e 90 dias a solo contaminado com o herbicida trifluralina em diferentes doses.

Efeitos	Bioensaios			
	Dobro	Campo	metade	um quarto
Aumento na taxa de renovação epitelial				
7 dias	-	++	-	-
90 dias	+++	-	-	-
Aumento de liberação de vesículas de secreção				
7 dias	+++	+	-	-
90 dias	++	+	-	-
Acúmulo de grânulos citoplasmáticos				
7 dias	+++	++	++	+
90 dias	++	+	-	-
Aumento na presença de hemócitos				
7 dias	++	++	-	-
90 dias	+++	++	-	-
Desestruturação do epitélio				
7 dias	-	-	-	-
90 dias	+++	++	-	-
Vacuolização do citoplasma das células epiteliais				
7 dias	-	-	-	-
90 dias	++	-	-	-

- ausência de alterações morfológicas; + alterações raras; ++ alterações que ocorreram moderadamente; +++ alterações que ocorreram frequentemente em grandes áreas.

Figuras

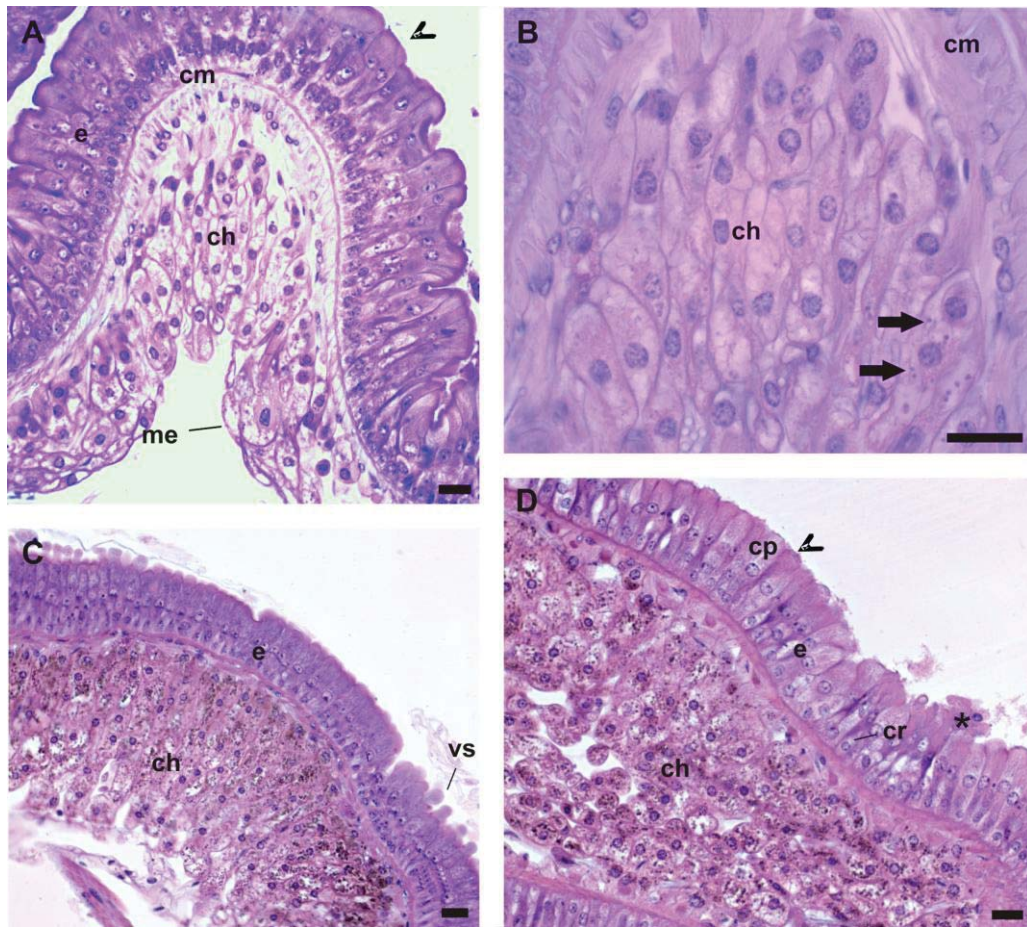


Figura 1. Secções histológicas do intestino médio do diplópodo *R. padbergi* coradas com hematoxilina e eosina. Grupo controle.

ch= camada de células hepáticas; cm= camada muscular; cp= célula principal; cr= célula regenerativa; e= epitélio; h= hemócito; me= membrana externa; cabeças de seta= bordo em escova; setas= grânulos citoplasmáticos; vs= vesícula de secreção; *= renovação epitelial. Barras: 20µm.

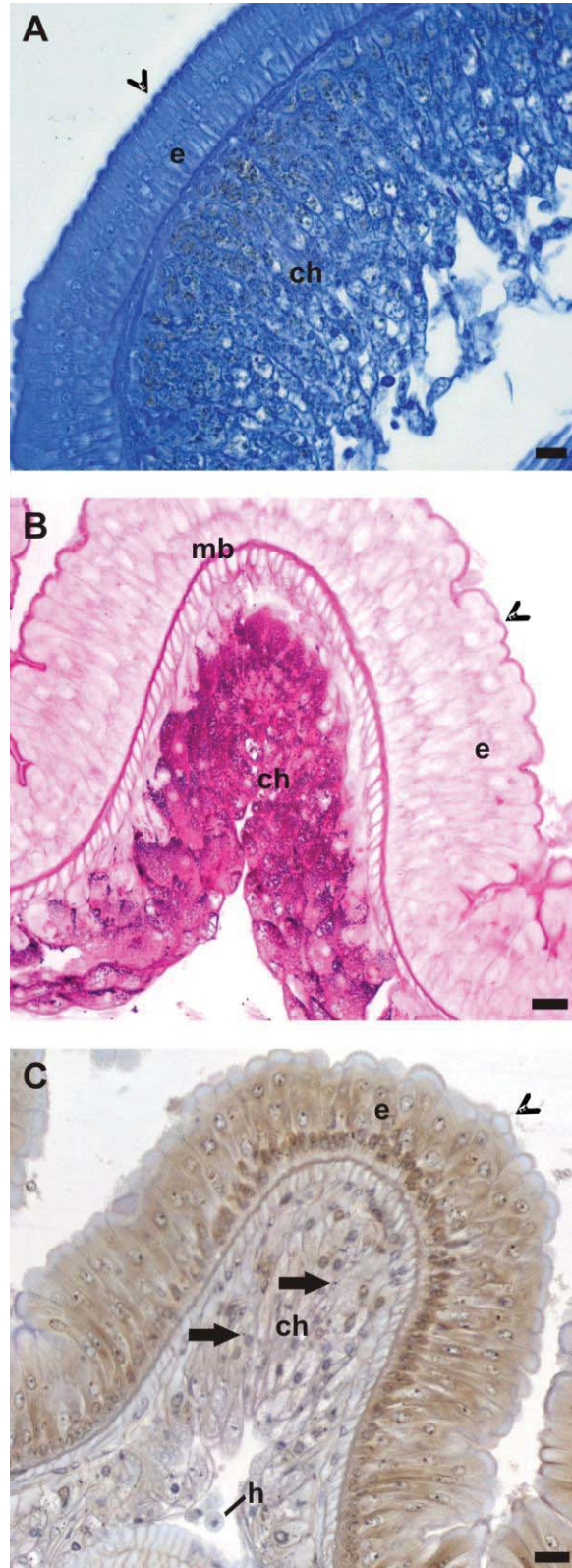


Figura 2. Secções histológicas do intestino médio do diplópodo *R. padbergi* submetidas a técnica de azul de bromofenol (A), PAS (B) e von Kossa (C). Grupo controle.

ch= camada de células hepáticas; cm= camada muscular; e= epitélio; h= hemócito; mb= membrana basal; cabeças de seta= bordo em escova; setas= grânulos citoplasmáticos. Barras: 20µm.

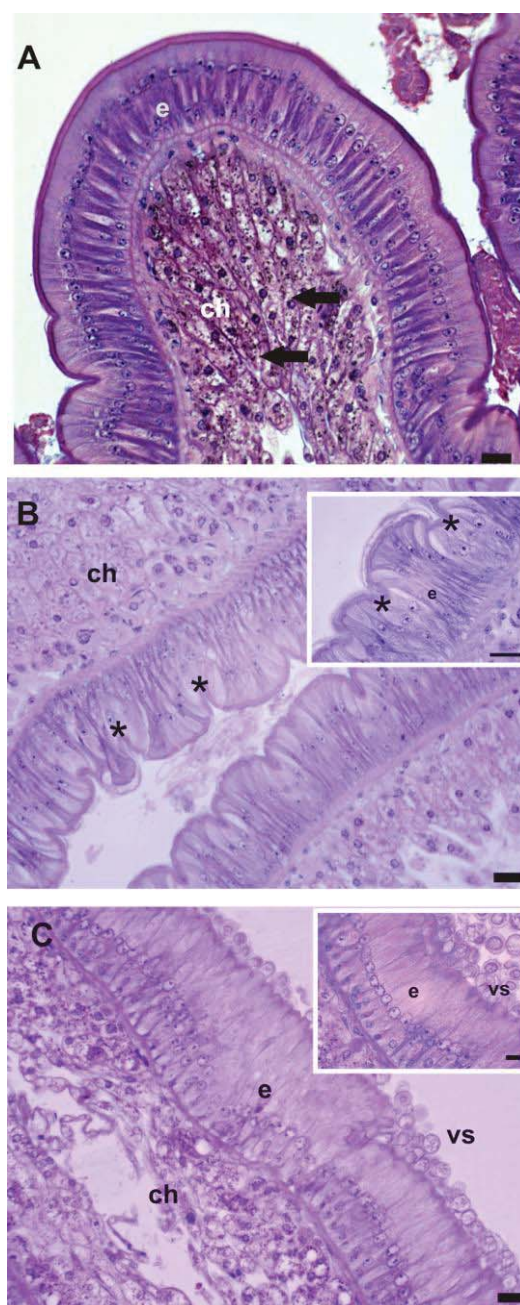


Figura 3. Secções histológicas do intestino médio do diplópodo *R. padbergi* coradas hematoxilina e eosina. Grupo metade (A), grupo campo (B) e grupo dobro (C). Exposição aguda (7 dias).

ch= camada de células hepáticas; e= epitélio; setas em A = grânulos citoplasmáticos; vs= vesícula de secreção e *= renovação epitelial. Barras: 20 μ m.

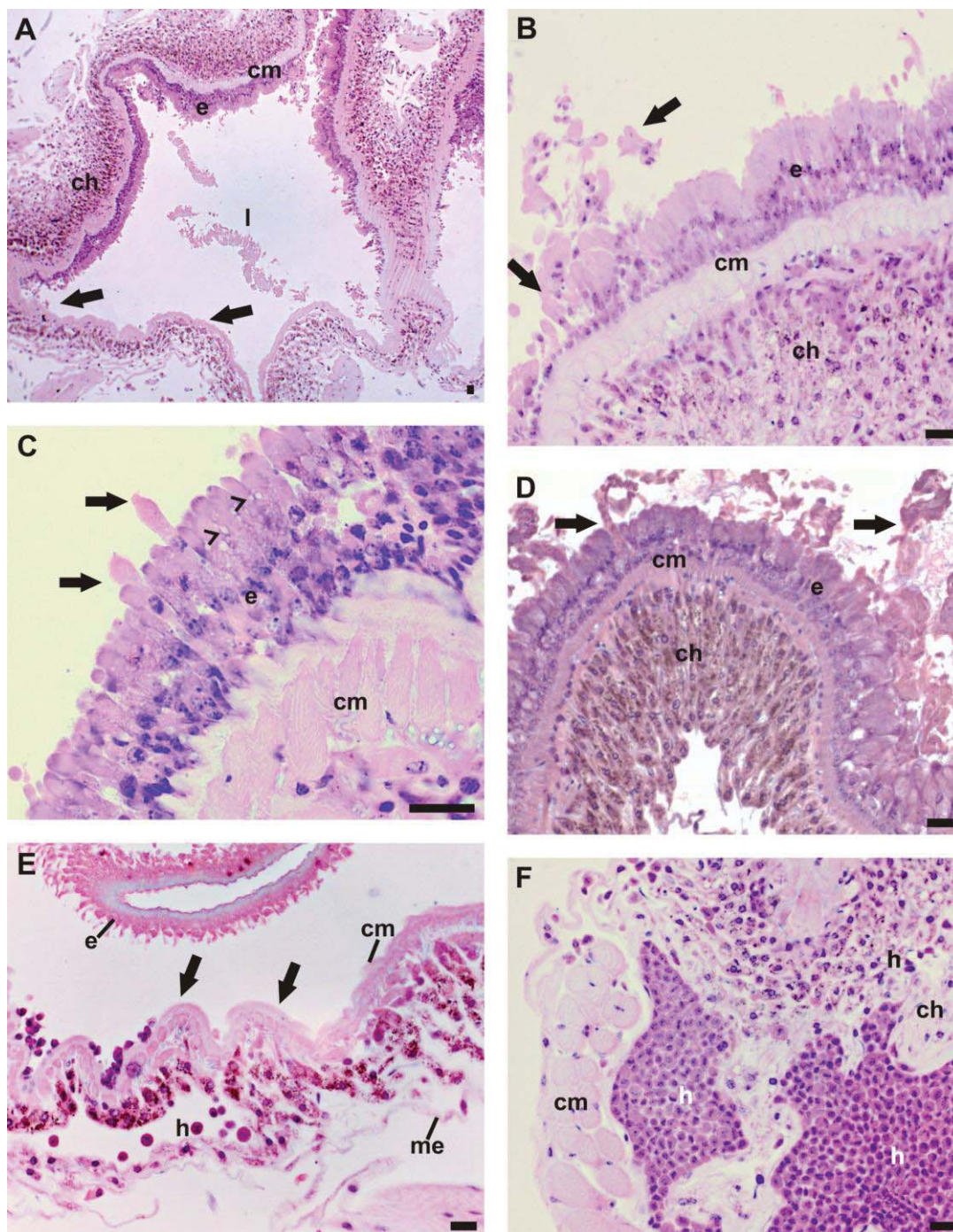


Figura 4. Secções histológicas do intestino médio do diplópodo *R. padbergi* coradas com hematoxilina e eosina. Grupo dobro (A, B, C, D, E e F). Exposição subcrônica (90 dias). ch= camada de células hepáticas; cm= camada muscular; e= epitélio; h= hemócito; cabeças de seta= vacuolização e dilatação do espaço intercelular; l= lúmen; me= membrana externa; setas em A e E= deslocamento do epitélio; setas em B, C e D= deslocamento de células epiteliais para o lúmen. Barras: 20 μ m.

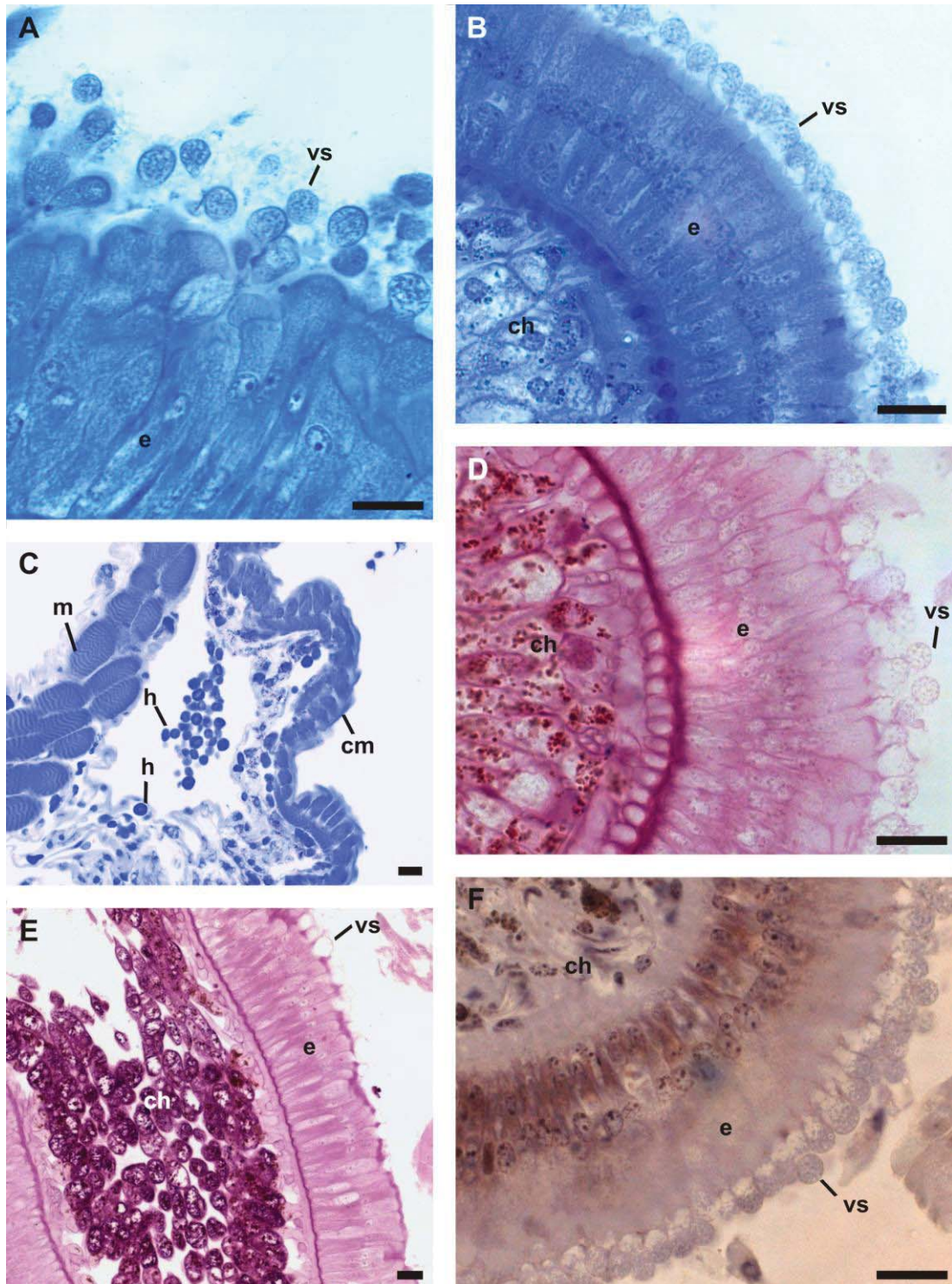


Figura 5. Secções histológicas do intestino médio do diplópodo *R. padbergi* submetidas às técnicas de azul de bromofenol (A, B e C), PAS (D e E) e von Kossa (F). Grupo dobro - 7 dias (B, D e F) e grupo dobro - 90 dias (A, C e E). ch= camada de células hepáticas; cm= camada muscular; e= epitélio; h= hemócito; m= musculatura; vs= vesícula de secreção. Barras: 20μm.

6. Considerações finais

Através das análises dos resultados obtidos, pode-se concluir que a trifluralina apresenta potencial tóxico ao diplópodo *R. padbergi*, uma vez que apresentou as seguintes alterações:

1. Aumento de grânulos citoplasmáticos na camada de células hepáticas, nos animais expostos a todas as concentrações, indicando provável processo de detoxicação do organismo do animal;
2. Aumento na presença de hemócitos, tanto isolados quanto agrupados, indicando lesão tecidual com provável processo inflamatório;
3. Aumento na liberação de vesículas de secreção, sendo esta uma forma de proteção do epitélio contra a ação de agentes tóxicos;
4. Presença de regiões com indicativo de renovação epitelial com liberação de células para o lúmen na tentativa de manter a função do órgão;
6. Pontos de vacuolização nas células principais e dilatação do espaço intercelular, possivelmente devido a um processo de necrose que ocasionou a desestabilização nas junções.

Diante do exposto, os resultados aqui observados alertam para um cuidado na utilização deste herbicida, já que este promoveu alterações significativas nas células do intestino médio do organismo-teste empregado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F.S. Guia de herbicidas; recomendações para o uso adequado em plantio direto e convencional. Londrina: **IAPAR**, 1985.

ARAB, Z.; ZACARIN, G.G.; FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; DOS SANTOS, M.G.; CABRERA, A.C. Composition of the defensive secretion of the Neotropical millipede *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Diplopoda, Spirobolida, Rhinocricidae). **Entomotropica**, v.18, n.2, p.79-82, 2003.

BELLINASSO, M.L.; GREER, C.W.; PERALBA, M.C.; HENRIQUES, J.A.; GAYLARDE, C.C. Biodegradation of the herbicide trifluralin by bacteria isolated from soil. **Rev. FEMS microbiology Ecology**. v.43, p. 191-194, 2003.

BYRD, R.A., MARKHAM, J. K., EMMERSON, J.L. Developmental toxicity of dinitroaniline herbicides in rats and rabbits. **Fundamental and Applied toxicology**. v. 26, p. 181-190, 1995.

CALDERÓN, M.J., HERMOSÍN, M.C., CORNEJO, J. y MORENO, F. Movilidad de trifluralina en laboreo tradicional y de conservación. **Estudios de la Zona No Saturada del Suelo**. Eds. R. Muñoz-Carpena, A. Ritter, C. Tascón: 1999. Tenerife, p.83-88.

CAMARGO-MATHIAS, M.I.; FONTANETTI, C.S.; MICÓ-BAGUER, E. Histochemical studies of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 ovaries (Diplopoda, Spirobolida, Rhinocricidae). **Cytobios**, v.94, p.169-184, 1998.

CAMARGO-MATHIAS, M.I.; FONTANETTI, C.S. Ultrastructural features of the fat body and oenocytes of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Diplopoda, Spirobolida). **Biocell**, Mendoza, v.24, p.1-12, 2000.

CAMARGO-MATHIAS, M.I.; FANTAZZINI, E.R.; FONTANETTI, C.S. Ultrastructural features of the fat midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda, Spirobolida). **Braz. J. Morphol. Sci.**, v.21, n.2, p.65-71, 2004.

COUCH, J. A.; WINSTEAD, J.T.; HANSEN, D.J.; GOODMAN, L.R. Vertebral dysplasia in young fish exposed to the herbicide trifluralin. **Journal of Fish Diseases**, v.2, p.35-42, 1979.

DANE, J.H.; TOPP, C. **Methods of Soil Analysis**. Part 4. Physical Methods (Soil Science Society of America Book Series. v.5, 2002.

DEUBER, R. **Botânica das plantas daninhas**. In: DEUBER, R. Ciência das plantas daninhas. Jaboticabal: FUNEP, 1992.

Diário Oficial da União. Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992. Termos das “Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registros e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins- nº 1, de 9 de dezembro de 1991”.

DORN, P.B.; VIPOND, T.E.; SALANITRO, J.P.; WISNIEWSKI, H.P. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox, and plants. *Rev. Chemosphere*, v.37, n.5, p.845-860, 1998.

FANTAZZINI, E.R.; FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Anatomy of the digestive tube and histochemistry of the foregut and salivary glands of “*Rhinocricus padbergi*”: Verhoeff, (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). *Arthropoda Selecta*, v.7, n.4, p.257-264, 1998.

FANTAZZINI, E.R.; FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Midgut of the millipede *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Diplopoda: Spirobolida): histology and histochemistry. *Arthropoda Selecta*, v.11, p.135-142, 2002.

FERNANDES, T.C.C. Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas – testes. 2005. Dissertação de mestrado, Programa de pós graduação em Ciências Biológicas (Biologia celular e molecular). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2005.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide biochemistry and Physiology*, v.88, p.252-259, 2007.

FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; TIRITAN, B.M.S. The fat body in *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda, Spirobolida). Ilheringia, *Sér. Zool.* v.94, n.4, p.351-355, 2004.

FONTANETTI, C.S.; TIRITAN, B.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Mineralized bodies in the fat body of *Rhinocricus padbergi* (DIPLOPODA). *Braz. J. morphol. Sci.*, v.23, p. 487-493, 2006.

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

GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. 1ª ed. Brasília: editora ULBRA, 2005, 394p.

HOFFMAN, R. L.; GOLOVATCH, S. I.; ADIS, J.; MORAIS, J. W. Diplopoda. In: **Amazonian Arachnida and Myriapoda**: identification keys to all classes, orders, families, some genera, and lists of known terrestrial species. Pensoft, 2002.

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

JUNQUEIRA, L.C.U., JUNQUEIRA, M.M.S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo; Livraria Editora Santos, 1983, 123p.

KIME, R.K.; GOLOVATCH, S.I. trends in the ecological strategies and evolution of millipedes (Diplopoda). *Biol. J. of the Lin. Soc.*, London, v.69, p. 333-349, 2000.

KÖHLER, H.R.; TRIEBSKORN, R. Assessment of the cytotoxic impact of heavy metals on soil invertebrates using a protocol integrating qualitative and quantitative components. **Biomarkers**, v.3, n.2, p.109-127, 1998.

KOTAKA, E.T.; ZAMBRONI, F.A.D. **Contribuições para a construção de diretrizes de avaliação do risco toxicológico de agrotóxicos**. Campinas, SP ILSI, Brasil, 2001.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas**. Nova Odessa: Editora Plantarum. 1990.

MACHADO, E. L.; MARTINS, A. F. Ozonização no pré-tratamento de efluentes da produção do herbicida trifluralina. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.9, p.117-123, 2004.

MACHADO, P.A.L. **Direito ambiental brasileiro**. São Paulo, Malheiros editores LTDA. 1031p, 2001.

NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE; M.B.N.L. Biomarcadores como Instrumentos Preventivos de Poluição. **Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações**. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. 2ª Edição. São Carlos: Ed. Rima, 2008. p. 413-432.

NOGAROL, L.R.; FONTANETTI, C.S. Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containind sewage mud: Tissular responses of the midgut. **Micron**, v.41, p. 239-246, 2010.

NOGAROL, L.R.; FONTANETTI, C.S. Ultrastructural Alterations in the Midgut of Diplopods after Subcronic Exposure to Substrate Containing Sewage mud. **Rev. Water Air Soil Pollut**, v.218, p.539-547, 2011.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. 4ª ed. Edinburg: Churchill Livingstone, 1985, 1055 p.

PEREZ, D.G.. FONTANETTI, C.S. Assessment of the Toxic Potencial of Sewage Sludge in the midgut of the Diplopod *Rhinocricus pagbergi*. **Rev. Water air Soil Pollution**, v.128, p.437-444, 2011a.

PEREZ, D.G., FONTANETTI, C.S. Hemocitical responses to environmental stress in invertebrates: a review. **Environmental monitoring and Assessment**, v.177, p.437-447, 2011b.

POLEKSIC, V.; KARAN, V. Effects of trifluralin on Carp: biochemical and Histological Evaluation. **Rev. Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.43, p. 213-221, 1999.

PROBST,G.W.; HERBERG, R.J.; HOLZER, F. J.; PARKA, S.J.; VAN DER SCHANS, C.; TEPE, J.B. Fate of trifluralin in soils and plants. **J. Agric. Food Chem**. v.15, n.4, p. 592-599, 2002.

RODRIGUÊS, B.N.; ALMEIDA, F.S. Guia de herbicidas. Edição dos autores, Londrina, 1985.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**, 7ª ed., Roca, SP/SP, 1145p., 2005.

STAAK, A.; FROST, M.; KRATZ, W. Ecotoxicological studies on the impact of the herbicide trifluralin on *Porcellio scaber* (Isopoda). **Rev. Applied soil ecology**. v.9, p.405-409, 1998.

SILVA, J.M.; SANTOS, J. R. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Oecol. Bras.** v.4, n.11, p. 565-573, 2007.

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

TAVARES, M.C.H.; LANDGRAF, M.D.; VIEIRA, E.M.; REZENDE, M.O.O. Estudo da adsorção-dessorção da trifluralina em solo e em ácido húmico. Ver. **Química Nova**. v.19, n.6, p.605-608, 1996.

TRIEBSKORN, R. KÖHLER, H.R.; ZANH, T.; VOGT, G. LUDWING, M.; RUMPF, S. KRATZMANN, M. ALBERTI, G.; STORCH, V. Invertebrate cells as targets for Hazardous substances ziet. **Fur angewandte Zool.** n. 78, p. 277-287, 1991.

TRIEBSKORN, R. Cytological changes in the digestive system of slugs induced by molluscides. **J. Med. appl. Malacol**, n.3, p. 113-123, 1991.

TOR, J.M.; XU, C.; WANDER, M.M.; SIMS, G.K. Trifluralin degradation under microbiologically induced nitrate and Fe (III) reducing conditions. **Rev. Environ. Sci. Technol.** n.34, p. 3148-3152, 2000.

UETA, J.; PEREIRA, N.L.; SHUHAMA, I.K.; CERDEIRA, A.L. Biodegradação de herbicidas e Biorremediação. Microrganismos degradadores do herbicida atrazina. **Biotecnologia**, Madri, v. 1, p. 10-13, 1998.

Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti
Orientadora

Larissa Rosa Nogarol
Co-orientadora

Vanessa Vanderléia Merlini
Aluna