
Ciências Biológicas

Vlamir Bozzatto de Oliveira

**Avaliação da toxicidade de lodo de esgoto
utilizando a análise morfológica do intestino
médio do diplópodo *Rhinocricus padbergi* como
biomarcador**

A large, abstract geometric design in the bottom half of the page, consisting of various shades of blue and white triangles and polygons arranged in a complex, overlapping pattern.

Rio Claro
2010

VLAMIR BOZZATTO DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE LODO DE ESGOTO
UTILIZANDO A ANÁLISE MORFOLÓGICA DO INTESTINO
MÉDIO DO DIPLÓPODO *Rhinocricus padbergi* COMO
BIOMARCADOR

Orientadora: Prof^a Dr^a CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

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 Bacharel e
Licenciado em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2010

574.5
O48a Oliveira, Vlamir Bozzatto de
Avaliação da toxicidade de lodo de esgoto utilizando a
análise morfológica do intestino médio do diplópodo
Rhinocricus padbergi como biomarcador / Vlamir Bozzatto de
Oliveira. - Rio Claro : [s.n.], 2010
46 f. : il., figs.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e
bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual
Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

1. Ecologia. 2. Ecotoxicologia terrestre. 3. Milípedes. 4.
Histologia. 5. Histopatologia. 5. ETES. I. Título.

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

Aos meus amados pais e aos meus queridos
avós maternos (in memoriam), ofereço.

Agradecimentos

É com imensa satisfação que concretizo uma das mais importantes etapas da minha vida: cursar uma universidade e, ainda por cima, estadual (a qual batalhei muito para estar dentro). Este sonho só foi possível de ser realizado por meio da ajuda de pessoas mais do que importantes para mim, pessoas cujo valor sentimental eu vou carregar para todo o sempre no meu coração e na minha memória.

E é por este motivo que eu agradeço e sempre agradecerei:

A Deus, diferentemente do conceito que tenho Dele em relação ao conceito das outras pessoas, mas que nunca me desamparou na hora em que precisei.

A minha mãe, Simone, que me mostrou desde pequeno o verdadeiro significado das palavras amor, carinho, atenção e compreensão. Serei eternamente grato por todas as coisas que você fez, faz e sempre fará por mim, minha Grande Mãe e Melhor Amiga.

Ao meu pai, Vlanir, que apesar da ausência em alguns momentos, me ensinou grandes valores para que eu me tornasse o homem que sou. Sem ele, eu jamais teria aprendido o que é ser uma pessoa justa e responsável. Obrigado por me dar tudo aquilo que eu sempre quis como filho pidão!

Aos meus avós maternos, Yolanda e Alcides (in memorian), que, mais do que avós, foram meus segundos pais, cujo amor e carinho eu vou carregar para todo o sempre em minha vida. Sinto falta de vocês, mas sei que onde quer que vocês estejam, vão sempre olhar por mim.

A melhor família do mundo, os Bozzattos, que, com toda certeza, estarão sempre comigo onde quer que eu esteja!

A minha orientadora, Carmem, que não me ensinou apenas a ser um bom pesquisador, me ensinou que errar é humano e que jamais devemos nos martirizar por isso, devendo sempre seguir em frente com nossos sonhos e objetivos. Obrigado por me mostrar o que é ser um exemplo de pessoa, cujo modelo eu quero seguir e ser algum dia quando crescer!

Aos meninos de casa, Murilo (Argentino), Hans, Raphael (Bairral) e Yuji (Naruto), por todos os momentos gostosos que convivi com vocês durante todos estes anos, desde as melhores risadas até as maiores brigas. Ah, obrigado por me compreenderem quanto aos meus distúrbios de humor e por sempre me ajudarem, cada um com o seu jeitinho especial de ser!

As maiores amigas que eu pude ter ganhado nesta vida unespiana, Larissa (Lari) e Dhara (Chaveirinho), por serem simplesmente vocês, com seu jeito meigo e cativante, estando sempre ao meu lado em TODOS os momentos. Obrigado por todos os conselhos, desabafos, risadas, comidinhas gostosas, passeios, e tudo mais! Obrigado por existirem na minha vida!

As pessoas que já estão longe por terem se formado ou se transferido, mas que conviveram muitos momentos ao meu lado e estarão sempre guardadas do lado esquerdo do peito, não é verdade, Hans, Patty (Abelha), Luciana (Emília), Amanda Corradini e Savana Diegues?!

Aos amigos universitários que me estenderam a mão na hora do meu desespero e solidão, que me mostraram muitas verdades que eu jamais enxerguei como pessoa: Mariana Gabriela (Sequela), Murilo (Argentino), Hans, Larissa (Lari) e Ariane (AriBafo).

Aos meus melhores amigos de sempre, Agostinho, Carlinhos, Ayumi e Vanessa, obrigado por TUDO mesmo, sem vocês, minha vida não teria sido metade do que foi. Tenho certeza de que muita coisa ainda está por vir e sei que vocês estarão presentes!

Ao pessoal fofote (orientados da Carmem), em especial a Juliana, Larissa (Lari), Raphael (Bairral), Ana (Matraca), Cintya, Tamaris e Danielle, por sempre me ajudarem com as loucuras da vida acadêmica, além de serem excelentes companhias de trabalho, sempre me alegrando!

As pessoas da minha turma (Biologia Integral 2006), em especial aos já citados (Lari, Bairral e Hans), além dos fofos Pamella (Pam), Tulio (Batata), Rafael (Gandhi) e André (Vésper), por serem sempre maravilhosas companhias de sala, relatórios, trabalhos, cantina, fofocas, conversas e tudo mais! Meu muito obrigado!

A Bel (Maria Izabel), Dora (Doralice), Patrícia e Chaud, por serem excelentes professores e profissionais em todos os sentidos, sempre me ajudando na hora de algum sufoco acadêmico. Agradeço em especial a Bel, que desde que me conheceu, já havia me dado um grande carinho como pessoa! Obrigado de verdade!

Aos infinitos bixos que tenho, mas em especial ao Otávio (Chico), Vinícius (Cabô), Isabela (Isa ou Meia Boca), Ana Carol (Danada), Imaira, Mariana Nery (Dengue), Ana Carol (Poita), Cristiane (Pulga), Dhara (Eco), Ana (Matraca), Paula (Pucca), Thayz (EF), Natasha (Eco), Gustavo (Febém – Geografia), por sempre serem pessoas meigas e atenciosas! Tenho um grande carinho por todos vocês!

Aos eternos baladeiros de plantão, Sequela, Vésper, Cabô, Chico, Agostinho, Carlinhos e em especial ao Marcel (Tommy Love), por me propiciarem as melhores baladas da minha vida! Obrigado por todo o fervor!

Ao Gerson e a Mônica, profissionais do departamento de Biologia, por sempre me ajudar nas horas que mais precisei de um apoio técnico. Mais ainda ao Gerson, por propiciar grandes descontrações e risadas no laboratório! Meu muito obrigado!

Aos funcionários da biblioteca, em especial a Mônica e a Rosângela, por serem sempre atenciosas comigo!

Ao CNPq/PIBIC e ao FUNDUNESP pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

Caso tenha me esquecido de alguém, peço desculpas, mas todos sabem como é a memória de um biólogo, não é verdade?! Mas saibam sempre de uma coisa: serei sempre grato a qualquer ato de bondade para com a minha pessoa, não importando de quem venha.

MUITO OBRIGADO, DE CORAÇÃO!

“Viva forever, I’ll be waiting,
Ever lasting like the sun,
Live forever, for the moment,
Ever searching for the one”

(Viva Forever - Spice Girls)

SUMÁRIO

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1. O lodo de esgoto.....	11
2.2. A classe Diplopoda.....	15
2.3. A espécie <i>Rhinocricus padbergi</i>	17
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1. Material.....	19
4.2. Métodos.....	19
4.3. Histologia.....	19
4.4. Histoquímica.....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
6. CONCLUSÕES FINAIS.....	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

Milípedes, popularmente conhecidos no Brasil como piolhos-de-cobra, emboá ou gongolô, constituem uma classe de Myriapoda (Diplopoda) de distribuição cosmopolita, sendo particularmente abundantes em regiões tropicais. São animais de hábitos noturnos que se protegem do sol vivendo embaixo de rochas, folhas, cascas de árvores e troncos. Alguns habitam antigas galerias de outros animais, tais como minhocas. Podem também ser comensais em ninhos de formigas e cupins (KÖHLER et al., 1995). Poucas espécies são encontradas no litoral, deserto ou ambiente semi-aquático (GILHODES, 1974; MEAD; GILHODES, 1974; TRAJANO et al., 2000). A estimativa para o grupo, atualmente, é de 80.000 espécies viventes, sendo cerca de 10.500 espécies descritas (RUPPERT et al., 2005).

Os diplópodos são grandes consumidores de matéria orgânica e podem ser, ainda, considerados importantes para a fertilidade do solo (DANGERFIELD; TELFORD, 1989). São invertebrados saprófagos que, através de sua dieta rica em detritos e matéria orgânica em decomposição, como frutas, musgos e relativa quantidade de matéria mineral do solo, promovem maior aeração e enriquecimento de matéria orgânica no solo em que estão presentes (SCHUBART, 1942). Estes animais ocupam o nível trófico de decompositores (PETERSEN; LUXTON, 1982), que, pelas suas fezes, secretam amônia e ácido úrico para o solo.

O trato digestório desses animais é tipicamente um tubo reto que se estende ao longo do corpo, desde a boca até o ânus. É dividido em intestino anterior, médio e posterior. Com exceção do intestino médio, todo o trato é revestido internamente por uma íntima cuticular, fazendo com que somente a porção mediana do trato seja responsável pela absorção de nutrientes. Em *Rhinocricus padbergi*, o intestino médio representa 39% do total da extensão do trato digestório; estende-se desde a válvula esofágica até as inserções dos túbulos de Malpighi, onde se inicia o intestino posterior. Histologicamente é provido de um epitélio, uma membrana basal, uma camada muscular e corpo gorduroso, revestido por uma membrana externa (FANTAZZINI et al., 2002).

Os estudos sobre a importância dos diplópodos na reciclagem de nutrientes do solo iniciaram na década de 30, época em que Romell (1935) fez o estudo do gênero *Fontaria* na América do Norte.

O estudo da atividade alimentar do diplópodo *Jonespeltis splendidus* na Índia, no processo de humificação do solo, realizado por Bano et al. (1976) revelou que este animal

consome terra, assimila a maior parte da matéria orgânica e devolve ao solo excretas nitrogenadas. O solo é humificado no trato gastrointestinal do animal, que contém grande quantidade de fungos e bactérias. Dessa forma, os excrementos do diplópodo acabam ficando com mais húmus do que a terra ingerida.

Devido ao hábito desses animais, algumas discussões têm sido realizadas acerca da possibilidade de utilização dos mesmos como organismos-teste na análise de camadas de solo (HOPKIN et al., 1985; TRIEBSKORN et al., 1991).

Certos fatores ambientais podem influenciar em variações fisiológicas de órgãos e tecidos, as quais se tornam claras ao se analisar células que compõe essas estruturas (STORCH, 1988 apud KOHLER; TRIEBSKORN, 1998). Essas variações induzem alterações celulares diversas, dependendo do tipo de órgão, célula e intensidade do estressor; as organelas presentes nas células também podem ser analisadas, visto que se comportam de maneira diferente dependendo do estressor (KÖHLER; TRIEBSKORN, 1998).

Pesquisas recentes têm proposto a utilização de lodo de esgoto na recuperação da estrutura física de solos degradados (KOCSSIS; De MARIA, 2004) e como fertilizante (PIRES; NASCIMENTO, 2003; VIEIRA; SILVA, 2004). A utilização de lodo de esgoto como adubo tem sido pauta de alguns seminários, visto que substitui os adubos minerais, diminui os gastos com adubação, aumenta a vida útil dos aterros sanitários, ajuda na deposição de rios e na reciclagem desse material, além de ser uma solução para a falta de espaço físico para dar um fim a todo lixo produzido pela sociedade. Esse lodo provém de ETEs (Estações de Tratamento de Esgoto), as quais realizam os tratamentos necessários na remoção de matéria orgânica biodegradável, porém não removendo os nutrientes presentes neste esgoto (CETESB, 2004), incluem-se aí os metais pesados e possíveis substâncias tóxicas, que podem ficar retidos no lodo. Por esse motivo, a aplicação do lodo na agricultura exige cuidados e análises mais detalhadas acerca das substâncias presentes, para se evitar danos à saúde da população e ao meio ambiente (PIRES; NASCIMENTO, 2003).

Invertebrados terrestres têm sido utilizados como bioindicadores de poluição ambiental causada por metais pesados como o cádmio, cobre, chumbo e zinco, devido ao seu extremo contato com os contaminantes do solo. A acumulação de metais pesados em vermes ou invertebrados que se alimentam deles tem sido comumente usada como fator de risco para o meio ambiente (ROBERTS; JOHNSON, 1978; IRELAND, 1979; BEYER et al., 1985; HEIKENS et al., 2001). Alguns trabalhos utilizando milípedes como bioindicadores em estudos de solo demonstram que a composição do odor exalado por eles é diferente dependendo do sexo e do hábitat (TAIRA; ARAKAKI, 2002; TAIRA et al., 2003). Um

estudo recente mostrou que o conteúdo de cálcio, magnésio, potássio, sódio, zinco e prata é maior em indivíduos juvenis do que em milípedes adultos, quando expostos a um solo contaminado com grande quantidade de metais (NAKAMURA et al., 2005).

A microscopia eletrônica e a histologia são métodos de diagnose bastante utilizados em seres humanos e vertebrados, para a análise de determinadas patologias; com isso, tais métodos passaram, também, a serem utilizados em invertebrados, com o objetivo de identificar danos ocasionados por determinadas substâncias tóxicas nas células desses animais (TRIEBKORN; KÜNST, 1990; TRIEBKORN et al., 1999), indicando o impacto da poluição ambiental nos mesmos (TRIEBKORN et al., 1991). Em diplópodos, alguns trabalhos com este enfoque foram realizados utilizando tubo digestivo e o corpo gorduroso (HOPKIN et al., 1985; TRIEBKORN et al., 1991; KÖHLER; TRIEBKORN, 1998; NOGAROL; FONTANETTI, 2010; GODOY; FONTANETTI, 2010).

Discutido o exposto acima, esse projeto tem como objetivo analisar e interpretar possíveis efeitos tóxicos do lodo de esgoto, no tubo digestório do diplópodo *Rhinocricus padbergi*. Essa espécie foi escolhida pela facilidade de coleta desse animal em nossa região e, além disso, por ter sido estudada pela equipe do projeto sob diferentes pontos (CAMARGO-MATHIAS et al., 1998; 2004; FANTAZZINI et al., 1998; CAMARGO-MATHIAS; FONTANETTI, 2000; FANTAZZINI et al., 2002; ARAB et al., 2003; FONTANETTI; CAMARGO-MATHIAS, 2004; MIYOSHI et al., 2005; FONTANETTI et al., 2004; 2006; CALLIGARIS et al., 2005).

Este projeto está vinculado a uma proposta da CETESB (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO BÁSICO) sobre “Caracterização de lodos de ETE”, em que foram analisados lodos de seis ETES provenientes de diferentes cidades do estado de São Paulo. Esse foi o único teste ecotoxicológico vinculado ao projeto da CETESB.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Lodo de Esgoto

O lodo de esgoto é um resíduo orgânico cuja constituição apresenta elevadas taxas de nitrogênio e fósforo, bem como uma concentração significativa de micronutrientes (SOPPER, 1993). Trata-se de um material heterogêneo, cuja composição depende do tipo de tratamento utilizado para tratar o esgoto e das características das fontes geradoras, ou seja, origem doméstica ou industrial.

De acordo com a Water Environment Federation (WEF – 1993) o termo “biossólido” é utilizado para designar o lodo produzido pelos sistemas de tratamentos biológicos de esgotos, desde que seu destino final tenha uma finalidade útil. Este termo é reservado para um produto estabilizado, caso contrário são empregados os termos torta, lodo ou sólidos.

Os processos de tratamento deste resíduo orgânico já são de conhecimento geral, com algumas pequenas diferenças entre os diversos processos dentro dos países. O principal problema encontrado, e até o momento, de difícil solução, está na produção de lodos e seu destino final. Assim, as práticas para o aproveitamento ou simples disposição do lodo são também bastante antigas nos países mais desenvolvidos, sendo no entanto, ainda não satisfatórias. Na década de 70, devido as diversas práticas de destino final de lodos sem estudos adequados, o pouco controle ambiental e ainda a possível presença de produtos indesejáveis no ambiente, solo ou água, como até então era realizado, começou-se a regulamentar o lançamento do lodo no ambiente através de convenções ou acordos internacionais (VINCENT; CRITCHLEY, 1984).

No processo de tratamento gerador do lodo, a composição média do esgoto aponta para uma mistura de água (99,9%) e sólidos (0,1%), sendo que do total de sólidos, 70% são orgânicos (proteínas, carboidratos, gorduras, etc) e 30% inorgânicos (areia, sais, metais, etc).

O esgoto bruto chega à ETE (Estação de Tratamento de Esgoto) e nesta fase é realizada um tratamento preliminar, que consiste na remoção de materiais grosseiros (pedras, gravetos, garrafas, plásticos, etc.) através de uma grade manual e, da remoção de sólidos, tais como areia, com auxílio de um equipamento mecanizado denominado Rotamat. Estes materiais são transferidos para um recipiente, que é enviado para um aterro sanitário, e a parte líquida é bombeada para o tanque de armazenamento e homogeneização (TAR - tanque de armazenamento de resíduo), que se mantém sob constante agitação e aeração, evitando o desprendimento de mau cheiro.

Após a retirada dos sólidos, o resíduo é recalcado para os reatores aeróbios, chamados de SBR (Sequência de Reatores em Batelada). Tem início o tratamento secundário, onde o resíduo entra em contato com o lodo biológico composto, principalmente, por bactérias heterotróficas, quimioautótrofas, protozoários e micrometazoários, que serão responsáveis pelo tratamento. Estes microrganismos irão degradar a maior parte da matéria orgânica contida no resíduo, reduzindo consideravelmente sua carga orgânica inicial. Por se tratar de material bacteriano, o seu crescimento é muito acentuado, devido a alta taxa de reprodução das bactérias, principalmente, sob temperaturas elevadas. O excesso de lodo formado no SBR

é descartado para um tanque de estabilização e adensamento de lodo, que após conclusão desta etapa é recalcado para os leitos de secagem, perdendo água por infiltração e evaporação.

O tratamento secundário possui um ciclo de trabalho composto pelo enchimento, aeração, sedimentação e descarte, definido pela qualidade desejada para o efluente, vazão média da estação, características físico-químicas do afluente, características biológicas do lodo, dentre outras. No final deste ciclo, ou seja, após sedimentação, é feito o descarte do sobrenadante, sendo recalcado até o filtro de areia com granulometria adequada para retirada dos sólidos que ainda persistam. Após a filtração, o efluente segue por gravidade para a câmara de desinfecção, onde recebe hipoclorito de sódio assegurando a qualidade final do efluente que será lançado no corpo receptor (LEITE et al., 2008).

Os métodos de disposição mais comuns para o lodo são: incineração, aterro, disposição no oceano, recuperação de terrenos de mineração, digestão em lagoas e uso agrícola (HARRIS-PIERCE et al., 1995). Atualmente, diversos usos alternativos têm sido desenvolvidos, como: agregados leves para construção civil, fabricação de tijolos e cerâmicas, fonte de energia para produção de cimento e conversão do lodo em óleo combustível (TSUTIYA, 2001). Além disso, a aplicação deste resíduo em terras agrícolas tem-se tornado cada vez mais atraente, pelos altos custos e impactos ambientais relacionados com os demais métodos de disposição, pela presença de nutrientes e matéria orgânica no lodo e pela necessidade de redução de custos na agricultura.

A reciclagem agrícola de biossólidos de origem doméstica é uma tecnologia aceitável, tanto como disposição de resíduos como de enriquecimento do solo. A aplicação de biossólidos no solo geralmente promove um aumento na fertilidade, devido à mineralização da matéria orgânica, estimula a atividade microbiana e ainda ocasiona uma melhoria das características físicas ao reduzir a densidade, aumentar a porosidade e estabilizar os agregados. Além disso, o incremento de carbono orgânico no solo resulta no aumento da capacidade de retenção de água (STAMATIADIS et al., 1999). O uso deste resíduo na restauração dos solos tem apresentado efeitos benéficos na qualidade e avaliabilidade dos nutrientes na estrutura estável do solo, influenciando diretamente na resistência deste à erosão (DEBOSZ et al., 2002).

Por outro lado, este processo exige a definição de critérios para sua implementação, principalmente no que se refere à lixiviação do nitrato (BUCHANAN; GLISSMAN, 1991) e a mobilidade de metais. A utilização do lodo de esgoto na agricultura não é isenta de problemas. Em sua composição, o lodo pode conter metais, como Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Fe, Co, Mn, Mo, Hg, Sn e Zn, microrganismos patogênicos e compostos orgânicos tóxicos,

representando, portanto, riscos diretos ou indiretos à saúde humana e animal (GIBBS et al., 1997; TAN, 2000).

Segundo Ortiz e Alcañiz (2006), a adição de largas quantidades de lodo de esgoto no solo não gera nenhum tipo de inibição na produção de biomassa do ambiente. Mesmo com a absorção eficiente de alguns tipos de metais, não há nenhum acúmulo de concentração fitotóxica para as plantas, além de demonstrar que quanto maior a quantidade de metais presentes nesse lodo, maior será atividade de absorção dos metais pelas plantas (GALDOS et al., 2004; ORTIZ; ALCANIZ, 2006).

Várias são as culturas nas quais o biossólido tem sido utilizado como adubo, não só aqui no Brasil como no mundo inteiro. Segundo Andreoli (1999), as culturas já estudadas que absorveram bem o biossólido são: feijão, milho, cana-de-açúcar e frutíferas em geral. Quando o planejamento é executado adequadamente, os projetos de aproveitamento do lodo exercem efeitos ambientais positivos e aumentam o rendimento agrícola.

A adição de metais pesados no solo e a sua subsequente transferência à cadeia alimentar é um dos riscos potenciais associados a essa prática, além de poder ser lixiviado, colocando em risco a qualidade da água subterrânea, presente nos lençóis freáticos (ELLIOT et al., 1986). O risco é elevado quanto ao efeito de solubilização destes metais por meio da adição de substâncias orgânicas (McBRIDE et al., 1997), uma vez que estes mecanismos são considerados complexos, pois dependem da natureza do agente orgânico, contribuindo assim, para uma possível restrição ou elevação da mobilidade de metais pelo solo, sendo que a mineralização destes está diretamente relacionada à quantidade de metais que as plantas absorvem durante a sua nutrição (DOMSCH, 1984).

Ao adicionar-se lodo de esgoto ao solo ocorrem processos de decomposição da matéria orgânica que afetam duas propriedades relativas à acidez do solo: pH e poder tampão do solo, que é a sua resistência à variação de pH. A acidificação decorre da formação de ácidos orgânicos e reações de nitrificação de nitrogênio amoniacal já presente no lodo ou gerado na mineralização de nitrogênio orgânico. Simultaneamente, o acúmulo de matéria orgânica pode alterar a capacidade de troca de cátions, afetando o poder tampão. As mudanças no poder tampão poderão refletir-se na medida do pH, sem que haja, porém, quaisquer relações proporcionais entre essas duas propriedades, em solos com diferentes manejos (BOEIRA, 2008).

Os metais podem causar graves danos às células, as quais apresentam vários mecanismos de ação: alterações imunossupressoras; competição de co-fatores de atividade enzimática em sítios específicos; inibição de enzimas vitais, como por exemplo, as que

participam da fosforilação oxidativa; alteração das estruturas celulares, principalmente na porção lipoprotéica de membrana (PASCALICCHIO, 2002), além de poder induzir à formação de tumores em organismos expostos, incluindo seres humanos (SUNDERMAN, 1984).

Além de problemas relacionados aos metais pesados, temos a contaminação microbiológica do lodo, que está ligada ao material fecal existente no esgoto. No esgoto são encontrados vírus, fungos, bactérias e parasitas (protozoários e helmintos) e embora a grande maioria destes organismos seja inofensiva, alguns grupos de patogênicos são considerados perigosos, pelo risco que representam a saúde humana e animal. O conteúdo microbiológico das fezes é diluído no esgoto, que mesmo assim apresenta concentração elevada de microrganismos.

A legislação atual referente à disposição de lodo de esgoto no estado de São Paulo (Norma P 4230, CETESB, 1999) estabelece limites quanto às quantidades de lodo que podem ser aplicadas no solo, baseando-se, principalmente, nos teores de metais. Uma vez que a dose aplicada em áreas agrícolas é calculada de acordo com os teores de N no lodo com a necessidade deste elemento pela cultura, pode ocorrer um acúmulo de P e metais no solo. No solo, reações de adsorção, complexação, oxidação-redução e precipitação controlam a disponibilidade e solubilidade dos metais. A disponibilidade destes elementos, na forma catiônica, depende do pH do solo. Os biossólidos são uma das maiores fontes de metais em solos agrícolas. Apesar de essenciais para as atividades microbianas, em concentrações excessivas podem causar toxicidade, inibindo atividades enzimáticas essenciais, e alterar a estrutura de comunidades microbianas (TORSVIK et al., 1998), bem como influenciar no metabolismo/fisiologia de diversos espécimens da fauna edáfica.

Pesquisas recentes relacionando o uso de lodo de esgoto em solos e sua influência em animais são raras. Neste sentido, um estudo utilizando ovelhas grávidas expostas a pastagens fertilizadas com lodo de esgoto mostrou que exposições prolongadas ao lodo resultam em grandes reduções (32-51%) no número e na função hormonal de dois tipos de células somáticas: as células de Sertoli e de Leydig. Essas mudanças estão associadas ao crescimento reduzido dos fetos masculinos e femininos (PAUL et al., 2005).

2.2. A Classe Diplopoda

A classe Diplopoda, segundo Hoffman (1979), é subdividida em três subclasses: Pselaphognata, Pentazonia e Helminthomorpha. Na primeira, os machos são desprovidos de aparatos especializados para a cópula, os gonopódios. Já os Pentazonia apresentam estas

estruturas localizadas na região posterior do corpo. Na última subclasse citada, os machos apresentam um ou ambos os pares de pernas do sétimo segmento modificados em gonopódios. A subclasse *Helmintomorpha* engloba sete subordens e uma posição superordial incerta, reunindo um total de 11 ordens com numerosas famílias, tribos, gêneros e espécies.

Os diplópodos possuem o corpo alongado, cilíndrico ou levemente achatado. O tamanho do adulto pode variar entre 2 mm e 30 cm (HOFFMAN et al., 2002) e a coloração é bastante variada, existindo tons de vermelho, marrom e amarelo; cores vivas são raras ou constituem pequenos detalhes. São caracterizados pela presença de dois pares de pernas por segmento.

A grande maioria dos representantes possui um exoesqueleto forte e resistente, devido à impregnação do tegumento por sais de cálcio. O tronco é segmentado, sendo que apenas os dois primeiros e alguns dos últimos não possuem apêndices. Em certas ordens, o número de segmentos é constante, porém em outras pode variar de acordo com a idade e sexo. A presença de poro repugnatório em determinados segmentos é característica da grande maioria das ordens, havendo raras exceções. Esse poro corresponde à abertura de uma glândula produtora de secreção que contém basicamente cianeto e iodo, com cheiro forte e desagradável, repelindo predadores (SCHUBART, 1942). O conteúdo e quantidade desta secreção são diretamente influenciados pelo tipo de vegetação, e, conseqüentemente, podem estar relacionados a impactos causados no solo. Além da eliminação de substâncias com odor forte e do tegumento resistente, uma outra forma de defesa dos diplópodos é o enrolamento do corpo em espiral plana.

Dangerfield e Telford (1989) afirmam que os diplópodos são grandes consumidores de matéria orgânica e podem ser, ainda, considerados importantes para a fertilidade do solo. Com isso, o animal assimila a maior parte da matéria orgânica e devolve ao solo excretas nitrogenadas. O solo é humificado no trato digestório do animal, que contém uma grande quantidade de fungos e bactérias. Dessa forma, os excrementos do diplópodo acabam ficando com mais húmus do que a terra ingerida (BANO et al., 1976).

A digestão em *Diplopoda* é processada em dois estágios. O primeiro envolve a ingestão rápida de material solúvel durante a quebra de alimentos pelas mandíbulas onde os nutrientes passam diretamente pela membrana peritrófica e microvilos na porção mediana do intestino. No segundo estágio, a digestão é completada e o restante dos nutrientes é liberado. O intestino anterior parece ter uma pequena participação no processo de digestão em *Diplopoda*, sendo o intestino médio o centro das atividades digestivas. Glândulas salivares encontradas na porção anterior do intestino são responsáveis pela produção de secreção que

lubrifica o alimento, a qual pode conter enzimas digestivas. Tais glândulas podem auxiliar na produção de secreções envolvidas na construção de ninhos para os diplópodos (NUNEZ; CRAWFORD, 1977; HUBERT, 1979). As enzimas digestivas originadas pela secreção das glândulas salivares e por células do epitélio do intestino médio, suplementadas por enzimas secretadas por microrganismos misturam-se com o alimento no lúmen, facilitando o processo de digestão (NUNEZ; CRAWFORD, 1977; HOPKIN; READ, 1992).

Estudos relacionados com a morfologia interna do tubo digestório de diplópodos são escassos e, geralmente, estão relacionados a espécies européias ou da América do Norte (HEFNER, 1929; HOPKIN; READ, 1992; MILEY, 1930, NUNEZ; CRAWFORD, 1977). Em espécies brasileiras, poucos são os estudos realizados (FONTANETTI; CAMARGO-MATHIAS, 1997; FANTAZZINI et al., 1998; 2002; FONTANETTI et al., 2000; CAMARGO-MATHIAS et al., 2004; MIYOSHI et al., 2005).

Devido ao contato direto com contaminantes presentes no solo, vários estudos tem sido conduzidos em relação à acumulação de metais pesados em invertebrados terrestres (HOPKIN et al., 1989; GRÄFF et al., 1997).

Os diplópodos podem metabolizar e/ou acumular vários tipos de metais, principalmente no intestino médio e corpo gorduroso (KÖHLER et al., 1995).

2.3. A espécie *Rhinocricus padbergi*

Rhinocricus padbergi, descrita por Verhoeff em 1938, é uma espécie de ampla distribuição no estado de São Paulo, sendo registrada também para o Rio de Janeiro; pertence à ordem Spirobolida, considerada hoje uma espécie sinantrópica. Característica do sudeste brasileiro, esta espécie é caracterizada por animais de tamanho médio; ocorrem em locais úmidos e escuros na serrapilheira, com temperatura amena. Tem aparecido nos mais variados tipos de ambiente urbano, sendo frequentemente encontrado dentro de casas. Possuem como característica marcante a presença de glândulas repugnatórias a partir do 6º segmento do corpo, produtoras de benzoquinona (ARAB et al., 2003). Tal substância tem uma ação irritativa da mucosa, podendo afetar seres humanos, causando fobia em relação a estes animais, o que vem afetando as populações desta espécie em alguns estados brasileiros, como por exemplo, no Rio de Janeiro (FONTANETTI; BICHUETTE, 2008).

Histologicamente, o intestino anterior e posterior de *R. padbergi* são semelhantes, uma vez que possuem a mesma origem embrionária, sendo compostos, a partir do lúmen, de uma íntima cuticular, epitélio, membrana basal, camada muscular formada de fibras musculares estriadas e membrana celular externa (FANTAZZINI et al., 1998).

Nos estudos do intestino médio de *R. padbergi* observou-se a presença de numerosas vilosidades, sendo o intestino médio formado por um epitélio, uma membrana basal e uma camada muscular, circundado pelo corpo gorduroso. As análises histoquímicas revelaram uma forte presença de proteínas no epitélio, no corpo gorduroso, nas células hepáticas e nas secreções. Essas secreções possivelmente estão envolvidas na liberação de enzimas digestivas no lúmen. Os polissacarídeos neutros estão presentes apenas nas células mucosas e os polissacarídeos ácidos foram observados no bordo em escova. As células principais apresentaram grande quantidade de lipídios na porção média superior, sugerindo que essa região libere esses lipídios no lúmen. O cálcio foi encontrado na porção apical das células principais do epitélio, no bordo em escova e nas células da camada de corpo gorduroso, sugerindo que o epitélio possa atuar no transporte deste elemento (FANTAZZINI et al., 2002).

A constituição epitelial pseudoestratificada do intestino médio se dá por três tipos de células: as principais, que apresentam bordo em escova bem desenvolvido e podem estar envolvidas com o mecanismo de absorção de nutrientes da alimentação e também no transporte de elementos a partir da hemolinfa; células regenerativas, que ocorrem na região basal do epitélio; e células secretoras, que ficam inseridas entre as células principais e servem para produzir substâncias de natureza glicoprotéica que auxiliam na absorção e/ou na lubrificação da superfície epitelial. Existe uma diferenciação entre as regiões apical e basal da célula: a região basal apresenta espaços intercelulares e também evaginações em direção à lâmina basal. As células principais apresentam retículo endoplasmático rugoso abundante e inúmeros complexos de Golgi. Estas características são análogas em diplópodos e insetos (HUBERT, 1979; CAMARGO-MATHIAS et al., 2004).

3. OBJETIVOS

Este projeto teve por finalidade:

1. Expor espécimens de *R. padbergi* em substratos oriundos do lodo de esgoto, observando o comportamento dos animais;
2. Após a exposição, o tubo digestório desses animais foi analisado histologicamente, principalmente o intestino médio (local onde ocorre a digestão), para verificação de possíveis alterações morfológicas;

3. Em seguida, foram utilizados testes histoquímicos, para a detecção de proteínas, cálcio e carboidratos, com a finalidade de se observar possíveis alterações na produção de algum elemento, o qual possa significar determinadas alterações morfológicas e/ou fisiológicas;
4. Verificar a viabilidade de se utilizar diplópodos como bioindicador de solos impactados, além de se verificar a viabilidade do intestino médio como biomarcador.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material

Os espécimens de *R. padbergi* foram coletados manualmente na cidade de Rio Claro, SP, onde esta espécie é abundante; os exemplares foram levados ao laboratório onde ficaram aclimatados a $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ por um período de 15 dias, em solo oriundo do local de coleta dos animais.

Após este período, foram montados bioensaios com 15 indivíduos cada um, expondo-os por períodos de 7 e 15 dias, para a observação de resposta aguda; os animais do controle foram mantidos em solo oriundo do local de coleta dos animais.

Nos bioensaios foram utilizados substratos de lodo cedidos pela Dra. Gisela Umbuzeiro (Profa Associada da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP), oriundos de E.T.E. (Estação de Tratamento de Esgoto) das cidades de Americana e Vinhedo, SP. Devido a uma recomendação feita pela CETESB, os animais foram expostos ao lodo diluído nas seguintes concentrações nas diferentes cidades: 10% e lodo puro (cidade de Americana/amostra PCJ-1) e 1%, 10% e 50% (cidade de Vinhedo/amostra PCJ-3) em terra oriunda do local de coleta, com a finalidade de se avaliar e comparar as possíveis alterações morfológicas que este lodo pode causar no intestino médio destes animais em resposta à toxicidade das amostras utilizadas.

4.2. Métodos

Após exposição, os animais foram anestesiados e dissecados em solução fisiológica, para a retirada do intestino médio, o qual foi fixado em paraformaldeído 4% e Carnoy, dependendo da técnica empregada; posteriormente, foi colocado em tampão fosfato de sódio pH 7,4 e mantido em geladeira.

4.3. Histologia

O material foi desidratado em soluções de etanol a 70, 80, 90 e 95%, durante 10 a 15 minutos cada banho e então, transferido para uma solução de resina (JB-4 –Polaron Instruments/BIO RAD), durante 24 horas em geladeira.

Finalmente, o material foi incluído com resina contendo catalisador; depois de polimerizados, os blocos foram seccionados com auxílio de micrótomo Sorvall JB-4 BIO RAD; os cortes obtidos, de 0.5 μ m de espessura, foram hidratados e recolhidos em lâminas. Depois de secas, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, conforme rotina histológica, para posterior observação e documentação fotográfica.

4.4. 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 paraformaldeído 4% por aproximadamente 24 horas; coloração pela solução de azul de bromofenol à temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas; lavagem das lâminas contendo os cortes em água e banho em ácido acético por 5 minutos.

b. Polissacarídeos neutros

- **Técnica do PAS** (segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Fixação em Carnoy por 24 horas; reação de PAS (oxidação por 60 minutos em ácido periódico 1%; reação pelo reativo de Schiff por 1 hora no escuro; lavagem em água sulfurosa por 9 minutos e lavagem em água corrente por 30 minutos).

c. Cálcio

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

Fixação em paraformaldeído 4% 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 fotográfico; imersão em tiosulfato de sódio ou fixador fotográfico F-5 (Kodak) por 5 minutos; contracoloração dos núcleos com hematoxilina; montagem das lâminas em gelatina glicerina.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram apresentados na forma de artigo, o qual foi encaminhado para publicação na revista Micron (Oxford).

ARTIGO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE LODO DE ESGOTO POR MEIO DA ANÁLISE MORFOLÓGICA DO INTESTINO MÉDIO DO DIPLÓPODO *Rhinocricus padbergi*

Vlamir Bozzatto de Oliveira, Carmem Silvia Fontanetti

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE LODO DE ESGOTO POR MEIO DA ANÁLISE MORFOLÓGICA DO INTESTINO MÉDIO DO DIPLÓPODO *Rhinocricus padbergi*

Vlamir Bozzatto¹; Carmem Silvia Fontanetti^{2*}

^{1,2} Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, Brasil

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

Resumo

Os diplópodos são invertebrados saprófagos, ágeis em colonizar várias camadas do solo, incluindo plantas e madeira em decomposição; alimentam-se de detritos e matéria orgânica em decomposição, promovendo maior aeração e enriquecimento mineral no solo em que estão presentes. Devido aos seus hábitos, os diplópodos têm sido indicados para estudos que visam analisar possíveis efeitos tóxicos de solos impactados sobre a fauna edáfica. Neste sentido, este trabalho pretendeu verificar a viabilidade de se utilizar o intestino médio de diplópodos como biomarcador de solos expostos ao lodo de esgoto oriundo de Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs). Foram utilizadas técnicas histológicas e histoquímicas, aplicadas no intestino médio da espécie *Rhinocricus padbergi*, local onde ocorre a digestão. Duas amostras de lodo de esgoto oriundas de duas cidades do interior do estado de São Paulo, Brasil, foram utilizadas, ambas pertencentes à Bacia Piracicaba-Capivari-Jundiaí (PCJ-1 e PCJ-3). Os animais foram expostos por períodos de 7 e 15 dias às concentrações de 10% e lodo puro para a amostra PCJ-1 de lodo e às concentrações de 1%, 10% e 50% de lodo para a amostra PCJ-3. O material exposto à amostra PCJ-1 apresentou aumento na presença de grânulos citoplasmáticos nas células da camada do corpo gorduroso em ambas as concentrações em todos os períodos e um pequeno aumento na taxa de renovação epitelial. Já o material da amostra PCJ-3, além das mesmas alterações observadas na amostra PCJ-1, apresentou também alta quantidade de polissacarídeos neutros nas células do corpo gorduroso. Em virtude destas respostas tissulares, pode-se concluir que a amostra de lodo PCJ-3 apresentou maior toxicidade quando comparada à amostra de lodo PCJ-1.

Palavras-chave: milípedes, histologia, histopatologia, ETEs, lodo de esgoto.

1. Introdução

Milípedes, popularmente conhecidos no Brasil como piolhos-de-cobra, emboá ou gongolô, constituem uma classe de Myriapoda (Diplopoda) de distribuição cosmopolita, sendo particularmente abundantes em regiões tropicais. São animais de corpos cilíndricos e alongados, os quais são facilmente identificados por seus dois pares de pernas em cada segmento corpóreo (Ruppert et al., 2005).

Os diplópodos são grandes consumidores de matéria orgânica e podem ser, ainda, considerados importantes para a fertilidade do solo (Dangerfield e Telford, 1989). São invertebrados saprófagos e decompositores que, por meio de sua dieta rica em detritos e matéria orgânica em decomposição, promovem maior aeração, ciclagem de nutrientes e, conseqüentemente, enriquecimento do solo em que estão presentes (Schubart, 1942; Petersen e Luxton, 1982).

Devido ao hábito destes animais, eles têm sido considerados bons indicadores ambientais, sendo utilizados como organismos-testes em algumas análises de solo (Hopkin et al., 1985; Godoy e Fontanetti, 2010; Nogarol e Fontanetti, 2010).

As ETEs (Estações de Tratamento de Esgoto) têm enfrentado o problema da destinação a ser dada ao lodo de esgoto, resíduo que permanece após o tratamento dos esgotos domésticos e industriais (Boeira et al., 2002). Algumas pesquisas têm proposto a utilização de lodo de esgoto na recuperação da estrutura física de solos degradados (Kocssis e De Maria, 2004) e como fertilizante (Pires e Nascimento, 2003; Vieira e Silva, 2004). Porém, pelo fato de o lodo de esgoto não estar totalmente livre de contaminantes, como metais, patógenos e substâncias tóxicas, sua aplicação exige muita cautela para que não haja danos à população ou ao meio ambiente (De Camargo, 2008).

O presente trabalho teve como objetivo analisar e interpretar possíveis efeitos tóxicos do lodo de esgoto no tubo digestório do diplópodo *Rhinocricus padbergi*. Essa espécie foi escolhida pela facilidade de coleta desse animal em nossa região e pelo histórico de estudos com a mesma em diferentes aspectos (Camargo-Mathias et al., 1998; 2004; Fantazzini et al., 1998; 2002; Camargo-Mathias e Fontanetti, 2000; Arab et al., 2003; Fontanetti e Camargo-Mathias, 2004; Calligaris et al., 2005; Miyoshi et al., 2005; Fontanetti et al., 2004; 2006).

2. Material e Métodos

2.1. Bioensaios

Os espécimens de *R. padbergi* foram coletados manualmente na cidade de Rio Claro/SP (22°24'36''S; 47°33'36''W), em Julho de 2007; os exemplares foram levados ao

laboratório onde ficaram aclimatados a $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de 15 dias, em solo oriundo do local de coleta dos animais.

Após este período, foram montados bioensaios com 15 indivíduos cada um, expondo-os por períodos de 7 e 15 dias, com o intuito de se observar respostas agudas; os animais do controle foram mantidos em solo oriundo do local de coleta. Nos bioensaios foram utilizados substratos de lodo oriundos de ETEs de duas cidades do interior do estado de São Paulo pertencentes à Bacia Piracicaba-Capivari-Jundiaí (PCJ), denominadas de PCJ-1 e PCJ-3 (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental).

Os animais foram expostos às seguintes misturas: 1. lodo puro PCJ-1; 2. lodo PCJ-1 na concentração de 10% (misturado em terra oriunda do local de coleta dos animais); 3. lodo PCJ-3 na concentração de 1%; 4. lodo PCJ-3 misturado na concentração de 10%; 5. lodo PCJ-3 misturado na concentração de 50% (todos misturados em terra oriunda do local de coleta dos animais), com a finalidade de se avaliar e comparar a toxicidade dessas amostras nas diferentes concentrações apresentadas.

2.2. Histologia e Histoquímica

Após exposição, os animais foram anestesiados em éter sulfúrico e dissecados em solução fisiológica, para a retirada do intestino médio, o qual foi fixado em duas soluções: paraformaldeído 4% e Carnoy (6 álcool: 3 clorofórmio: 1 ácido acético). Então, o material foi desidratado em séries graduadas de 70-100% de soluções de etanol, embebido em uma solução de resina JB-4, por 24h. O material foi incluído com resina contendo catalisador; depois de polimerizados, os blocos foram seccionados a $5\mu\text{m}$. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina ou foram aplicadas a testes histoquímicos.

Testes histoquímicos para a detecção de proteínas (azul de bromofenol, segundo Pearse (1985) – material fixado em paraformaldeído), polissacarídeos neutros (técnica do PAS (Ácido Periódico de Schiff), segundo Junqueira; Junqueira (1983) – material fixado em Carnoy) e cálcio (método de von Kossa, segundo Junqueira; Junqueira (1983) – material fixado em paraformaldeído) foram aplicados.

3. Resultados

3.1. Grupo Controle

Histologicamente, o grupo controle apresentou o intestino médio com a constituição típica da espécie, observado por Fantazzini et al. (2002), ou seja, é formado por um epitélio pseudoestratificado com bordo em escova, apoiado em uma espessa membrana basal, seguido

de uma camada muscular, camada de corpo gorduroso, revestido de uma membrana externa (Fig. 1A). No epitélio, pode-se encontrar três tipos celulares: as células principais, as quais apresentam núcleo na região médio-apical, com formatos variando do redondo ao oval; a membrana apical dessas células apresenta numerosas microvilosidades, formando um bordo em escova bem definido; as células regenerativas, que se localizam na base do epitélio; e as células secretoras, distribuídas entre as células principais. Abaixo do epitélio observa-se uma camada muscular. As células da camada de corpo gorduroso apresentam núcleos arredondados e citoplasma heterogêneo, preenchido por inúmeros grânulos citoplasmáticos evidentes. É comum observar hemócitos espalhados por entre as células do corpo gorduroso.

Na análise histoquímica, os polissacarídeos neutros são encontrados, em maior quantidade, no bordo em escova e na membrana basal (Fig. 1B); alguns hemócitos são evidenciados por esta técnica. A detecção de proteínas é forte em todos os constituintes do intestino médio dos espécimens (Fig. 1C); alguns hemócitos coram-se por esta técnica. O cálcio é encontrado em algumas células epiteliais (Fig. 1D).

3.2. Amostra de lodo de esgoto PCJ-1

3.2.a. Exposição por 7 dias

O grupo exposto ao lodo misturado em 10% apresentou um pequeno aumento no número de grânulos citoplasmáticos nas células do corpo gorduroso. Já no lodo puro é possível visualizar maior quantidade desses grânulos citoplasmáticos no corpo gorduroso.

Foi detectada uma reação moderada aos polissacarídeos neutros na porção médio-apical das células principais do material exposto ao lodo puro. Observou-se um aumento de reação positiva ao teste de detecção de cálcio nas células epiteliais em ambas as concentrações de lodo.

3.2.b. Exposição por 15 dias

A análise do grupo exposto ao lodo misturado em 10% revelou maior quantidade de grânulos citoplasmáticos das células do corpo gorduroso; foram visualizadas regiões que apresentam células mais baixas que o comumente observado, indicando que ocorreu renovação epitelial nestes pontos (asteriscos na fig. 2A). Em lodo puro, os animais apresentaram as células do corpo gorduroso com maior quantidade de grânulos citoplasmáticos (Fig. 2B); foi observada a mesma evidência de renovação epitelial.

Em lodo puro, observou-se vários hemócitos positivos à reação de PAS (Fig. 2C); as mesmas observações feitas na detecção de cálcio no lodo puro exposto a 7 dias foram encontradas aqui (Figs. 2D, 2E, 2F).

3.3. Amostra de lodo de esgoto PCJ-3

3.3.a. Exposição por 7 dias

Foi detectado um pequeno aumento do número de grânulos citoplasmáticos nas células do corpo gorduroso dos animais expostos à concentração de lodo em 10%. Já os animais expostos ao lodo misturado à 50% evidenciaram maior quantidade de grânulos citoplasmáticos nas células do corpo gorduroso. Além disso, o material apresentou pontos de renovação epitelial (asteriscos nas figs. 3A, E), bem como a presença de hemócitos por entre as células do epitélio.

As análises histoquímicas detectaram uma forte reação aos polissacarídeos neutros nas células do corpo gorduroso do material exposto ao lodo em todas as concentrações (Fig. 3B). Observou-se a presença de cálcio nas células epiteliais que estavam sendo liberadas para o lúmen (asterisco na fig. 3C).

3.3.b. Exposição por 15 dias

Em 1% de concentração, é possível verificar um aumento no índice de pontos de renovação epitelial. Nas células do corpo gorduroso pode-se visualizar o aumento do número de grânulos citoplasmáticos. Em lodo misturado à 10% é possível observar evidências de intensa renovação epitelial. Houve, também, aumento no número de grânulos citoplasmáticos das células do corpo gorduroso (Fig. 3D).

As amostras misturadas à 1% e à 10% de concentração evidenciaram forte reação do cálcio nas células do epitélio. Na concentração de 50% de lodo, o material revelou alta quantidade de polissacarídeos neutros nas células do corpo gorduroso. O cálcio foi detectado, em maior intensidade, nas células do epitélio (Fig. 3F).

4. Discussão

O diplópodo *R. padbergi*, escolhido como organismo-teste para o presente experimento, é reconhecidamente resistente a diversas substâncias químicas (Fontanetti, comunicação pessoal). Apesar desta resistência, os animais expostos ao lodo de esgoto morreram logo após duas semanas de exposição.

Algumas espécies de milípedes parecem evitar alimentos que podem intoxicá-los. Hopkin et al. (1985) relataram que certos milípedes evitam comer alimentos contaminados com níveis tóxicos de zinco, cádmio e chumbo. Em alguns experimentos, milípedes podem ter morrido de fome porque rejeitaram o alimento contaminado ao invés de terem morrido por

níveis tóxicos de poluentes contidos no solo que estavam (Hopkin e Read, 1992). No presente trabalho foi observado que alguns indivíduos de *R. padbergi* conseguiram revolver bastante o substrato em que se encontravam. Durante esse revolvimento, esse animal realiza parte da alimentação, o que indica que parte dos indivíduos do grupo experimental se alimentou da matéria contida no lodo de esgoto.

Quando os agentes invasores conseguem ultrapassar o tegumento e o trato digestório, tornam-se expostos a uma variedade de mecanismos celulares e humorais interagindo na defesa do hospedeiro. Em algumas espécies de diplópodos, o epitélio intestinal pode não funcionar eficientemente como uma barreira à passagem de determinadas substâncias do lúmen para outros tecidos do corpo, como os metais (Hopkin et al., 1985). No presente experimento, pode-se observar que os animais expostos ao lodo de esgoto foram prejudicados a nível celular, uma vez que apresentaram diversas alterações em sua fisiologia e morfologia.

Na camada de corpo gorduroso do intestino médio de *R. padbergi*, pode-se encontrar um aumento de grânulos citoplasmáticos, os quais estão relacionadas intimamente ao processo de bioacumulação de minerais nesses animais. Este fenômeno é um importante mecanismo para a manutenção da homeostase dos organismos. A importância da biomineralização está bem exemplificada em vários filos de invertebrados (Simkiss e Mason; 1984; Hopkin et al., 1989; Triebkorn et al., 1991; Köhler e Alberti, 1992). Insetos possuem várias estruturas com essa função, as quais incluem esferocristais e grânulos que contém minerais ricos em purina (Hubert, 1978; 1979). A acumulação desses elementos está relacionada com o processo de regulação iônica e engloba numerosos fenômenos fisiológicos, como a reciclagem, estocagem e excreção desses minerais. Estruturas semelhantes foram observadas no corpo gorduroso perivisceral (Fontanetti et al., 2006) e no citoplasma de ovócitos de *R. padbergi* (Fontanetti e Camargo-Mathias, 2004); a maioria dessas estruturas apresentavam cálcio em sua constituição. Estas estruturas, referidas como concentração de minerais ou esferocristais, consistem em metais (Ca, Mg, K, Fe, Zn, e Sr) complexados em fosfatos, carbonatos e cloretos.

De acordo com Hubert (1979), o intestino médio dos milípedes é um importante sítio de acumulação mineral e tem papel na regulação iônica do organismo. Conseqüentemente, o ciclo de eliminação desses grânulos pode ser uma forma de excreção. Um processo similar pode estar ocorrendo em *R. padbergi*, uma vez que observou-se uma intensa coloração positiva do epitélio na técnica pela detecção de cálcio.

Uma forma de eliminação destes minerais pode ocorrer junto com a renovação epitelial observada nos indivíduos expostos em todas as concentrações de lodo; durante a

expulsão do epitélio danificado para o lúmen, parte desse acúmulo mineral em esferas pode ter sido expelido juntamente com o epitélio ou parte deste. O epitélio, aparentemente danificado, é expelido para o lúmen intestinal, enquanto um novo epitélio é formado. Isto pode ter sido consequência de uma lesão, que se caracteriza, em insetos, por uma reação local do tecido à algum dano; a lesão pode evoluir de diferentes formas, sendo que numa delas o tecido lesado é perdido e, imediatamente repostado, constituindo o que se chama regeneração (Steinhaus, 1949). Tal expulsão pode ter acontecido devido a um dano que as substâncias presentes nas amostras de lodo em questão possam ter dado ao tecido.

Poderia se pensar em um tipo de destoxificação, ou seja, determinadas substâncias tóxicas para os animais são armazenadas dentro de células antes de serem eliminadas junto com as fezes. Geralmente, a destoxificação só é possível até que a concentração da substância tóxica não atinja um valor limitante. Se esse valor é excedido, o resultado é um dano celular ou inibição do desenvolvimento celular (Triebkorn et al., 1991). As células epiteliais do intestino médio são capazes de acumular metais não essenciais como o cádmio, em grânulos para reduzir os efeitos tóxicos. Um estudo demonstrou que as células do intestino médio são capazes de acumular metais e eliminá-los mais tardiamente pelas fezes (Vanderbulcke et al., 1998).

No presente estudo foi possível visualizar alta quantidade de polissacarídeos neutros presente nas células da camada de corpo gorduroso do intestino médio. A resposta tissular em questão pode estar relacionada com a grande quantidade de matéria orgânica disponível no lodo de esgoto, o que viabilizou a estocagem de nutrientes nas células da camada de corpo gorduroso de *R. padbergi*.

A composição do lodo de esgoto está intimamente relacionada ao nível sócio-cultural da população, pois, em última análise, os resíduos que dão origem aos lodos dependem dos hábitos alimentares, saneamento básico, saúde e, ainda, do estágio de desenvolvimento industrial da sociedade. O lodo de esgoto, em razão da procedência dos resíduos, pode ser classificado em doméstico ou industrial, havendo, quase sempre, uma concentração de metais bastante variável nesses dois tipos de lodo (Tsutyia, 2001; Godoy e Fontanetti, 2010).

Estudos realizados por Tsutyia (2001) mostram que não existe grandes diferenças em termos da presença de elementos químicos nos lodos de esgoto de diferentes localidades, porém, considerando-se os aspectos quantitativos, constata-se grande variabilidade, o que pode ser creditado à procedência do lodo.

Ambas as amostras aqui analisadas são oriundas de ETEs que recebem esgoto contendo resíduos domésticos e industriais, sendo estes a cana-de-açúcar e a laranja para o

setor primário e os vegetais, papel/celulose, usinas de açúcar e álcool para o setor secundário, o que caracteriza grande quantidade de matéria orgânica presente em ambos os lodos (Mielli et al., 2009).

Nos resultados encontrados, observou-se que os animais expostos à amostra PCJ-3 demonstraram maior índice de toxicidade celular, uma vez que apresentaram níveis moderados de bioacumulação e altos índices de renovação epitelial quando comparados aos animais expostos à amostra PCJ-1. Sendo assim, ao utilizarmos o intestino médio de *R. padbergi* para a avaliação da toxicidade de ambas amostras, percebemos que as respostas tissulares dos animais indicam maior toxicidade do lodo de esgoto da amostra PCJ-3 quando comparado ao lodo da amostra PCJ-1.

Os estudos sobre os efeitos da aplicação de lodo de esgoto em solos agrícolas, nas condições brasileiras de solo e clima e em longo prazo, ainda são incipientes e não servem de base para normas. As regulamentações existentes no Brasil – que, mesmo limitadas, ajudam a minimizar e controlar possíveis danos ambientais – devem ser revistas de acordo com o avanço do conhecimento sobre o tema. Com isso, a constante revisão de normas sobre o uso agrícola de lodo de esgoto e a realização contínua de estudos sobre esse uso são essenciais para garantir a sustentabilidade dessa prática (De Camargo et al., 2008).

Conclusões

Ao que tudo indica, em detrimento às respostas tissulares obtidas no intestino médio de *R. padbergi*, o lodo de esgoto da amostra PCJ-3 apresentou maior toxicidade celular quando comparado ao lodo da amostra PCJ-1. Ambas as amostras aqui em estudo contêm agentes tóxicos para a espécie *R. padbergi* quando aplicados diretamente no solo. De certo, as resoluções que aprovam a aplicabilidade do lodo de esgoto na agricultura no Brasil devem ser continuamente revistas, pois só assim será possível viabilizar a sua aplicação comercial sem que haja danos ao meio ambiente, bem como aos organismos que ali vivem.

Agradecimentos

Este trabalho teve o apoio financeiro do CNPq/PIBIC/UNESP (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e da FUNDUNESP (Fundação para o Desenvolvimento da UNESP). Os autores agradecem à Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro, à engenheira Samira Issa e ao Marcus da Matta pelo lodo de esgoto cedido, Gerson Mello Souza, pelo apoio técnico durante o processamento do material, aos biólogos Larissa Rosa

Nogarol, Raphael Bastão de Souza, Danielli Giuliano Perez e à Profa. Juliana Aparecida Preto de Godoy pela ajuda durante os experimentos.

Referências Bibliográficas

- Arab, A., Zacarin, G.G., Fontanetti, C.S., Camargo-Mathias, M.I., Dos Santos, M.G., Cabrera, A.C., 2003. Composition of the defensive secretion of the Neotropical millipede *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). *Entomotropica*. 18, 2, 79-82.
- Boeira, R.C., Ligo, M.A.V., Dynia, J.F., 2002. Mineralização de nitrogênio em solo tropical tratado com lodos de esgoto. *Pesq. Agropec. Bras. Brasília*. 37, 11, 1639-1647.
- Calligaris, I.B., Boccardo, L., Sanches, M.R., Fontanetti, C.S., 2005. Morphometric analysis of a population of diplopods of the genus *Rhinocricus* Karsch, 1881. *Folia Biologica (Praha)*, 51, 40-46.
- Camargo-Mathias, M.I., Fantazzini, E.R., Fontanetti, C.S., 2004. Ultrastructural features of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda: Spirobolida). *Braz. J. morphol. Sci.* 21, 2, 65-71.
- Camargo-Mathias, M.I., Fontanetti, C.S., 2000. Ultrastructural features of the fat body and oenocytes of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Diplopoda, Spirobolida). *Biocell Mendoza* 24, 1, 1-12.
- Camargo-Mathias, M.I., Fontanetti, C.S., Mico-Balaguer, E., 1998. Histochemical studies of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff ovaries (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). *Cytobios.* 94, 169-184.
- Dangerfield, J.M., Telford, S.R., 1989. Are millipedes important for soil fertility? *Zimbabwe Science News*. 23, 7/9, 66-68.
- De Camargo, O.A., Pires, A.M.M., Bettiol, W. Lodo na agricultura. *Ciência Hoje*. 42, 284, 68-70.
- Fantazzini, E.R., Fontanetti, C.S., Camargo-Mathias, M.I., 1998. Anatomy of the digestive tube, histology and histochemistry of the foregut and salivary glands of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda, Rhinocricidae). *Arthropoda Selecta*. 7, 256-264.
- Fantazzini, E.R., Fontanetti, C.S., Camargo-Mathias, M.I., 2002. Midgut of the millipede “*Rhinocricus padbergi*” Verhoeff, 1938 (Diplopoda: Spirobolida): histology and histochemistry. *Arthropoda Selecta*. 11, 135-142.
- Fontanetti, C.S., Camargo-Mathias, M.I., 2004. Presence of calcium in oocytes of the diplopod *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Spirobolida, Rhinocricidae). *Acta Histochemica*, 37, 5, 301-306.
- Fontanetti, C.S., Camargo-Mathias, M.I., Tiritan, B.M.S. 2004. The fat body in *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda, Spirobolida). *Iheringia Série Zoologia*, 94, 4, 351-355.

- Fontanetti, C.S., Tiritan, B., Camargo-Mathias, M.I., 2006. Mineralized bodies in the fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). *Braz. J. morphol. Sci.* 23, 487-493.
- Godoy, J.A.P., Fontanetti, C.S., 2010. Diplopds as bioindicators of soils: Analysis of midgut of individuals maintaineal in substract containing sewage sludge. *Water, Air, Soil Pollution*. 210, 1-4, 389-398.
- Hopkin, S.P., Hames, C.A.C.; Bragg, S., 1989. Terrestrial isopods as biological indicators of zinc pollution in the Reading area, South East England. *Monit. Zool. Ital.* 4, 477-488.
- Hopkin, S.P., Read, H.J., 1992. *The Biology of Millipedes*. Oxford University Press.
- Hopkin, S.P., Watson, K., Martin, M.H., Mould, M.L., 1985. The assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* and *Glomeris marginata* (Chil: Dipl.). *Bijdr. Duerk.* 55, 88-94.
- Hubert, M., 1978. Données histophysiologiques complémentaires sur les bioaccumulations minérales et puriques chez *Cylindroiulus londinensis* (Leach, 1814) (Diplopode, Iuloidea). *Arch. Zool. Exp. Gén.* 119, 669-683.
- Hubert, M., 1979. Localization and identification of mineral elements and nitrogenous waste in Diplopoda. In: *Myriapod Biology* (M. Camatini ed.), Academic Press: London. 127-134.
- Junqueira, L.C., Junqueira, L.M.M.S., 1983. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. São Paulo: Livraria Editora Santos.
- Kocssis, M.A., De Maria, I.C., 2004. O efeito do lodo de esgoto na recuperação da estrutura física de solos degradados. Available at: <<http://www.cibergeo.org/>> Access in 01/28/2008.
- Köhler, H.R., Alberti, G., 1992. The effect of heavy metal stress on the intestine of diplopods. In: E. Meyer, K. Thaler and W. Schedl, eds. *Advances in Myriapodology*. Innsbruck: Bern at-med Ver. Suppl. 10, 257-267.
- Mielli, A.C., Matta, M.E.M., Nersesyan, A., Saldiva, P.H.N., Umbuzeiro, G.A., 2009. Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. *Mutation Research*. 672, 51-54.
- Miyoshi, A.R., Gabriel, V.A., Fantazzini, E.R., Fontanetti, C.S., 2005. Microspines in the pylorus of *Pseudonannolene tricolor* and *Rhinocricus padbergi* (Arthropoda, Diplopoda). *Iher. Sér. Zool.*, 95, 183-187.
- Nogarol, L.R., Fontanetti, C.S., 2010. Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: Tissular responses of the midgut. *Micron (Oxford)*. 41, 239-246.
- Pearse, A.G.E., 1985. *Histochemistry: Theoretical and Apllied*. Churchill.
- Petersen, H., Luxton, M., 1982. A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos*. 39, 3, 291-357.

Pires, M.G., Nascimento, P.M., 2003. FEC pesquisa uso de lodo de esgoto como fertilizante. Available at: <<http://www.unicamp.br/saladeimprensa>>, Access in 01/28/2008.

Ruppert, E.E., Barnes, R.D., Fox, R.S., 2005. Zoologia dos Invertebrados: Uma Abordagem Funcional-Evolutiva. São Paulo.

Schubart, O., 1942. Os miriápodos e suas relações com a agricultura. Pap. Avul. Dep. Zool. 2, 16, 205-234.

Simkiss, K., Mason, A.Z., 1984. Cellular responses of molluscan tissue to environmental metals. Mar. Environ. Res. 14, 103-118.

Steinhaus, E.A.B., 1949. Principles of insect pathology. McGraw-Hill, New York.

Triebkorn, R., Köhler, H.R., Zanh, T., Vogt, G., Ludwig, M., Rumpf, S., Kratzmann, M., Alberti, G., Storch, V., 1991. Invertebrate cells as targets for Hazardous substances ziet. Fur angewandte Zool. 78, 277-287.

Tsutiya, M.T., 2001. Alternativas de disposição final de biossólidos. In: Tsutiya, M.T., Comparini, J.B., Sobrinho, P.A., Hespanhol, I., Carvalho, P.C.T., Melfi, A.J., Melo, W.J., Marques, M.O. Biossólidos na agricultura. São Paulo, SABESP.

Vanderbulcke, F., Grelle, C., Fabre, M.C., Descamps, M., 1998. Implication of the midgut of the centipede *Lithobius forficatus* in the heavy metal detoxification process. Ecotoxicol. Environ. Saf., 41, 258-268.

Vieira, R.F., Silva, C.M.M.S., 2004. Utilização do lodo de esgoto como fonte de fósforo na cultura de soja. EMBRAPA. Circular Técnica-6, Jaguariúna-SP.

LEGENDAS

Figuras 1A – D: Secções histológicas do intestino médio de *Rhinocricus padbergi*. **A.** corada com hematoxilina e eosina. **B.** submetida à técnica do PAS. **C.** submetida à técnica do azul de bromofenol. **D.** submetida ao método de von Kossa. Grupo controle.

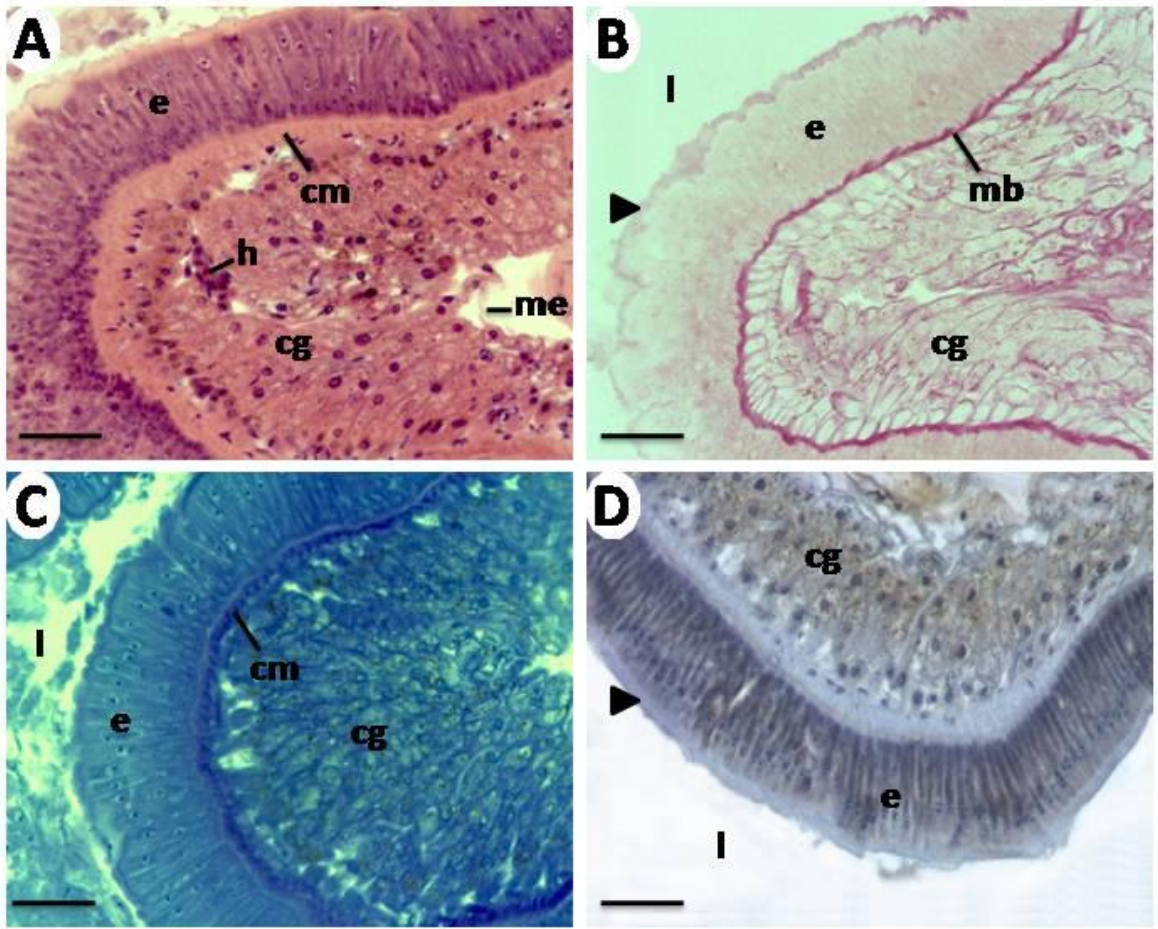
cg = corpo gorduroso; cm = camada muscular; e = epitélio; h = hemócito; l = lúmen; mb = membrana basal; me = membrana externa; cabeça de seta = bordo em escova. Escala = 20µm.

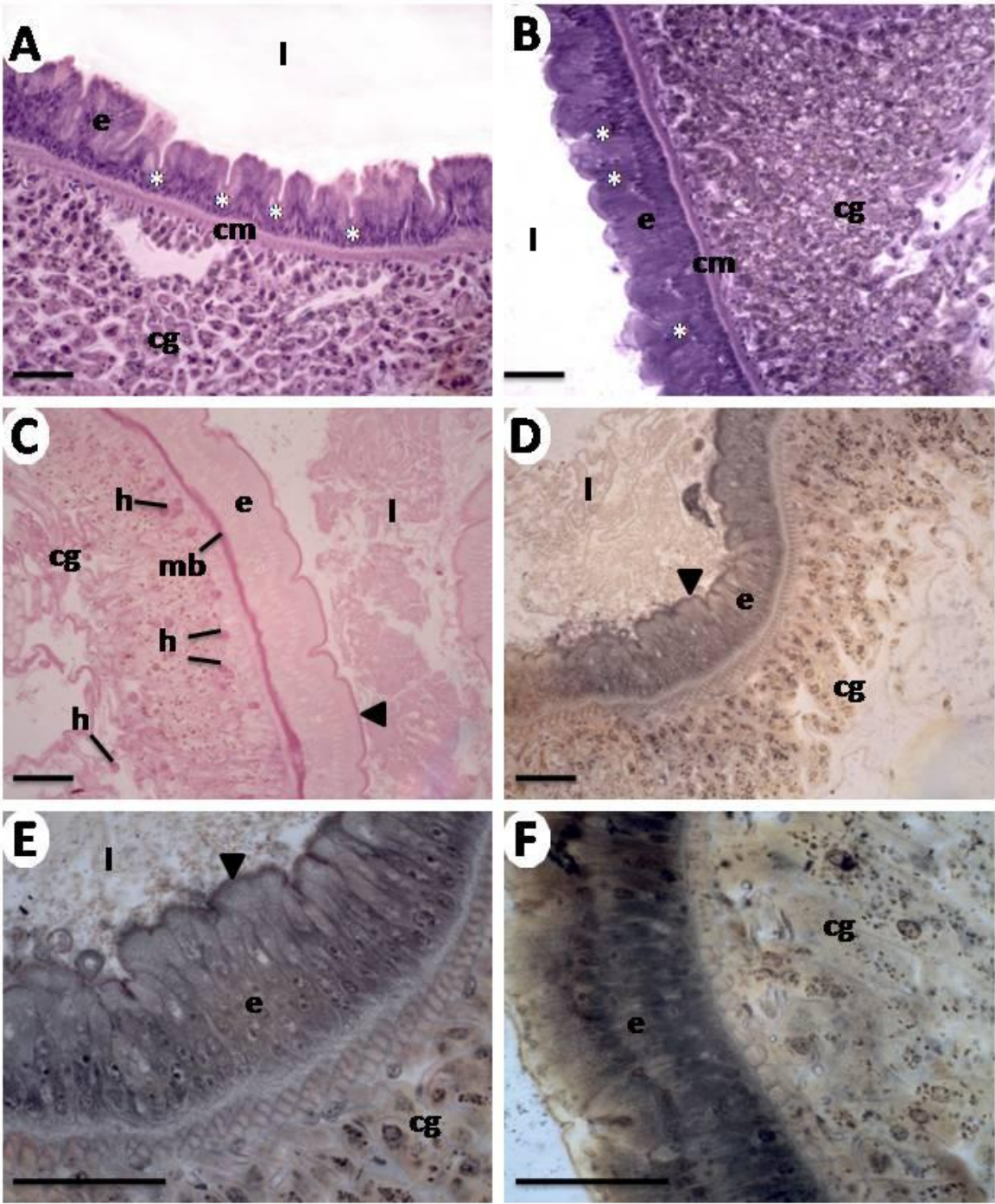
Figuras 2A – F: Secções histológicas do intestino médio de *Rhinocricus padbergi*. **A-B.** coradas com hematoxilina e eosina. **C.** submetida à técnica do PAS. **D-F.** submetidas ao método de von Kossa. Grupo exposto ao lodo de esgoto da amostra PCJ-1. **A.** diluído em 10% por 15 dias. **B.** puro por 15 dias. **C-E.** diluído em 10% por 15 dias. **F.** puro por 15 dias.

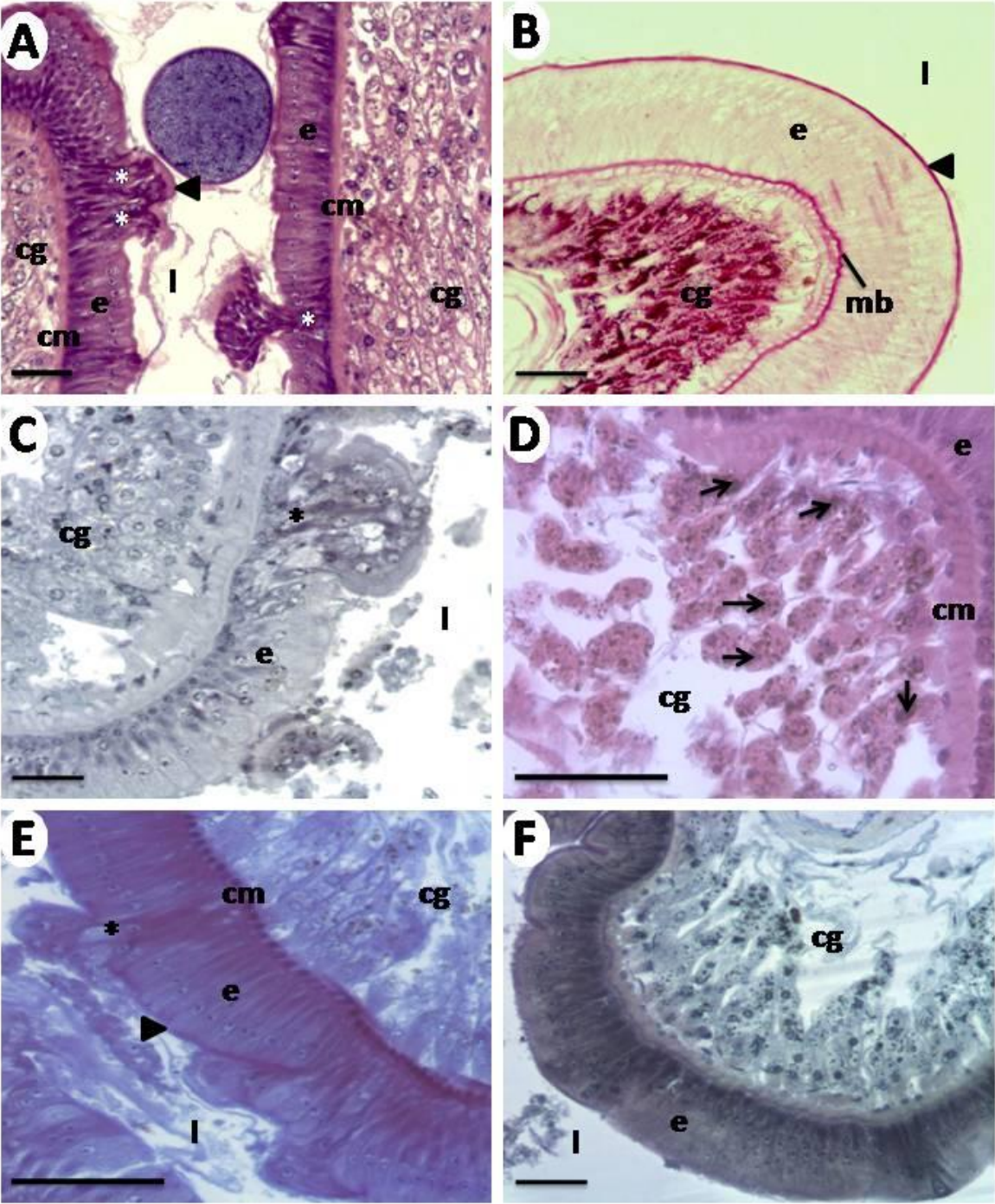
cg = corpo gorduroso; cm = camada muscular; e = epitélio; h = hemócito; l = lúmen; mb = membrana basal; asterisco = renovação epitelial; cabeça de seta = bordo em escova. Escala = 20µm.

Figuras 3A – F: Secções histológicas do intestino médio de *Rhinocricus padbergi*. **A,D.** coradas com hematoxilina e eosina. **B.** submetida à técnica do PAS. **C,F.** submetidas ao método de von Kossa. **E.** submetida à técnica do azul de bromofenol. Grupo exposto ao lodo de esgoto da amostra PCJ-3. **A.** diluído em 50% por 7 dias. **B.** diluído em 1% por 7 dias. **C.** diluído em 50% por 15 dias. **D.** diluído em 10% por 15 dias. **E.** diluído em 1% por 7 dias. **F.** diluído em 50% por 15 dias.

cg = corpo gorduroso; cm = camada muscular; e = epitélio; l = lúmen; mb = membrana basal; asterisco = renovação epitelial; cabeça de seta = bordo em escova; setas em D = grânulos citoplasmáticos. Escala = 20µm.







6. CONCLUSÕES FINAIS

A análise histológica e histoquímica do intestino médio dos animais expostos ao lodo de esgoto apresentaram as seguintes alterações:

- Aumento da quantidade de grânulos citoplasmáticos nas células do corpo gorduroso;
- Aumento da taxa de renovação epitelial;
- Aumento de polissacarídeos neutros nas células do corpo gorduroso;
- Aumento da quantidade de cálcio nas células epiteliais;

A estes resultados observados, foram atribuídas as seguintes conclusões:

- O lodo das cidades aqui em estudo são considerados agentes nocivos para a espécie *R. padbergi* quando aplicado diretamente no solo;
- Devido às respostas tissulares encontradas, constatou-se que o lodo de esgoto da amostra PCJ-3 apresentou maior toxicidade celular quando comparado ao lodo da amostra PCJ-1
- Os diplópodos, de um modo geral, são bons bioindicadores de solos impactados e a análise histológica e histoquímica do intestino médio um bom biomarcador.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREOLI, C. V. Reciclagem de biossólidos: transformando problemas em soluções. Curitiba: **Sanepar**, Finep, 1999, 288p.

ARAB, A.; 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.

BANO, K.; BAGYARAJ, D. J.; KRISHNAMOORTHY, R. V. Feeding activity of the millipede *Jonespeltis splendidus* (Verhoeff) in relations to soil organic matter. **Proc. Indian Acad. Sci. Sect. B.**, v.185, n.1, p.1-11, 1976.

BENINGER, P. G.; St-JEAN, S. D. POUSSART, Y. WARD, J. E. Gill function and mucocyte distribution in *Placopecten magellanicus* and *Mytilus edulis* (Mollusca: Bivalvia): the role of mucus in particle transport. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 98, p.275-282, 1993.

BEYER, W. N.; PATTEE, O. H.; SILEO, L.; HOFFMAN, D. J.; MULHERN, B. M. Metal contamination in wildlife living near to zinc smelters. **Environ. Pollut. Ser.**, v.38, p.63-86, 1985.

BOEIRA, R.C. Lodo de esgoto em culturas anuais: acidez do solo. Disponível em: <<http://www.ecoterrabrasil.com.br>>. Acesso em 28/01/2008.

BUCHANAN, M.; GLISSMAN, S. How compost fertilization affects soil nitrogen and crop yield. **Biocycle**, v.12, p.2-7, 1991.

CALLIGARIS, I.B.; BOCCARDO, L.; SANCHES, M.R.; FONTANETTI, C.S. Morphometric analysis of a population of diplopods of the genus *Rhinocricus* Karsch, 1881. **Folia Biologica (Praha)**, v.51, p.40-46, 2005.

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

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

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

CETESB-COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2003/CETESB** – São Paulo: CETESB. 2004, 273p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. Aplicação de biossólidos de sistemas de tratamento biológico em áreas agrícolas – **Critérios para projeto e operação: manual técnico**. São Paulo, 1999, 33p.

DANGERFIELD, J.M.; TELFORD, S.R. Are millipedes important for soil fertility? **Zimbabwe Science News**, v.23, n.7/9, p.66-68, 1989.

DEBOSZ, K.; PETERSEN, S. O.; KURE, L. K.; AMBUS, P. Evaluating effects of sewage sludge and household compost on soil physical, chemical and microbiological properties. **Appl. Soil Ecol.**, v.19, p.237-248, 2002.

DOMSCH, K. H. Effects of pesticides and heavy metals on biological processes in soil. **Plant Soil**, v.76, p.367-378, 1984.

ELLIOT, H. A.; LIBERRATY, M. R.; HUANG, C. P. Effect of iron oxide removal on heavy metal sorption by acid subsoils. **Water, Air, Soil Pollution**, Dordrecht, v. 37, n. 3/4, p.379-389, 1986.

FANTAZZINI, E. R.; FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Anatomy of the digestive tube, histology and histochemistry of the foregut and salivary glands of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda, Rhinocricidae). **Arthropoda Selecta**, v.7, p.256-264, 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.

FONTANETTI, C. S. *Rhinocricus padbergi* (Verhoeff, 1938). In: **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. v.1, p. 346-347, 2008.

FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Presence of calcium in oocytes of the diplopod *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Spirobolida, Rhinocricidae). **Acta Histochemica**, v.37, n.5, p.301-306, 2004.

FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Histoanatomy of the digestive tract in *Plusioporus setiger* diplopod (Brolemann, 1901) (Spirostreptida, Spirostreptidae). **Braz. J. Morphol. Sci.**, v.14, p.205-211, 1997.

FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; CAETANO, F. H. Apocrine secretion in the midgut of *Plusioporus setiger* (Brolemann, 1901) (Diplopoda, Spirostreptidae). **Naturalia**, v.26, p.35-42, 2000.

FONTANETTI, C.S., CAMARGO-MATHIAS, M.I.; TIRITAN, B.M.S. The fat body in *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda, Spirobolida). **Iheringia Série Zoologia**, Porto Alegre-RS, v.94, n.4, p.351-355, 2004.

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

GALDOS, M. V.; De MARIA, I. C.; CAMARGO, O. A. Atributos químicos e produção de milho em um latossolo vermelho eutroférico tratado com lodo de esgoto. **R. Bras. Ci. Solo**, v.28, p.569-577, 2004.

GIBBS, R. A., HU, C. J.; HO, G. E.; UNKOVICH, I. Regrowth of faecal coliforms and salmonellae in stored biosolids and soil amended with biosolids. **Water Sci. Technol.**, v.35, p.269-275, 1997.

GILHORDES, J. C. Etude du rythme d' activité locomotrice de *Callipus foetidissimus* (Diplopoda) em libre cours. **Ver. Comp. Animal**, v.8, p.63-70, 1974.

GODOY, J.A.P.; FONTANETTI, C.S. Diplopds as bioindicators of soils: Analysis of midgut of individuals maintaineal in substract containing Sewage sludge. **Water, Air, Soil Pollution** v.210, n.1-4, p.389-398, 2010.

GRÄFF, S.; BERKUS, M.; ALBERTI, G.; KÖHLER, H. R. Metal accumulation strategies in saprophaeous and phytophagous soil invertebrates: a quantitative comparsion. **BioMetals**, v.10, p.45-53, 1997.

HARRIS-PIERCE, R. L.; REDENTE, E. F. & BARBARICK, K. A. Sewage sludge application effects on runoff water quality in a semiarid grassland. **J. Environ. Qual.**, v.24, p.112-115, 1995.

HEFNER, R. A. The microanatomy of the alimentary canal of *Parajulus impressus* Say. **Transactions of the American Microscopical Society**, v.48, n.4, p.321-351, 1929.

HEIKENS, A.; PEIJNENBURG, W. J. G. M.; HENDRIKS, A. J. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. **Environ. Pollut.**, v.113, p.385-393, 2001.

HOFFMAN, R. L. **Classification of the Diplopoda**. Genève: Museum D'Histoire Naturelle, 1979, 238p.

HOFFMAN, R. L.; GOLOVATCH, S. I.; ADIS, J.; MORAIS, J. W. Diplopoda. In: **Arachnida and Myriapoda**. Ed J. Adis, p. 505-533, Sofia-Moscow: Pensoft, 2002.

HOPKIN, S. P.; READ, H. J. **The Biology of Millipedes**. Oxford, 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* (Chil: Dipl.). **Bijdr. Duerk.**, v.55, p.88-94, 1985.

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

HOPKIN, S.P.; WATSON, K.; MARTIN, M.H.; MOULD, M.L. The assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* and *Glomeris marginata* (Chil: Dipl.). **Bijdr. Duerk.**, v.55, p.88-94, 1985.

HUBERT, M. Localization and identification of mineral elements and nitrogenous waste in Diplopoda. In: **Myriapod Biology** (M. Camatini ed.), p127-134. Academic Press: London, 1979.

IRELAND, M. P. Metal accumulation by the earthworms *Lumbricus rubellus*, *Dendrobaena veneta* and *Eiseniella tetraedra* living in heavy metal polluted sites. **Environ. Pollut.**, v.19, p.201-206, 1979.

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

KOCSSIS, M.A.; De MARIA, I.C. O efeito do lodo de esgoto na recuperação da estrutura física de solos degradados. Disponível em: <<http://www.cibergeo.org/>> . Acessado em 28/01/2008.

KÖHLER, H. R.; KÖRTJE, K. H.; ALBERTI, G. Content, absorption quantities and intracellular storage sites of heavy metals in Diplopoda (Arthropoda). **BioMetals**, v.8, p37-46, 1995.

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.

LEITE, W. C. A., SCALIZE, Paulo Sergio; SITA, W. Desempenho de uma estação de tratamento de esgoto pelo processo de lodos ativos operando por batelada. Disponível em: <http://www.semase.sp.gov.br/Documentos/ASSEMAE/Trab_114.pdf>. Acesso em 28/01/2008.

McBRIDE, M.; SAUVE, S.; HENDERSHOT, W. Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. **Euro. J. Soil Sci.**, v.48, p.337-346, 1997.

McKILLUP, S. C.; BAILEY, P. T. Prospects for the biological control of the introduced millipede *Ommatoiulus moreletti* (Lucas) (Iulidae) in South Australia, In: **Proc. Of the 7th Intern. Congress of Myriap.** (ed. Minelli, A.), p.265-270, E.J. Brill, 1990.

MEAD, M.; GILHORDES, J. C. Organisation temporelle de l'activité locomotrice chez um animal cavernicole *Blaniulus Lichtensteini* Bröl. (Diplopoda). **Journal of Comparative Physiology: Neuroethology, Sensory, Neural and Behavioral Physiology.**, v.90, n.1, p.47-52, 1974.

MILEY, H. H. Internal anatomy of *Euryurus erythropygus* (Brant) (Diplopoda). **Ohio Journal of Science**, v.30, n.4, p.229-254, 1930.

MIYOSHI, A. R.; GABRIEL, V. A.; FANTAZZINI, E. R., FONTANETTI, C. S. Microspines in the pylorus of *Pseudonannolene tricolor* and *Rhinocricus padbergi* (Arthropoda, Diplopoda). **Iher. Sér. Zool.**, v.95, p.183-187, 2005.

NAKAMURA, K.; TAIRA, J.; HIGA, Y. Internal elements of the millipede *Chamberlinis hualienensis* Wang (Polydesmida: Paradoxosomatidae). **Appl. Entomol. Zool.**, v.40, n.2, p.283-288, 2005.

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

NUNEZ, F. S.; CRAWFORD, C. S. Anatomy and histology of the alimentary tract of the desert millipede *Orthoporus ornatus* (Girard) (Diplopoda: Spirostreptidae). **Journal of Morphology**, v.151, n.1, p.121-130, 1977.

ORTIZ, O.; ALCANIZ, J. M. Bioaccumulation of heavy metals in *Dactylis glomerata* L. growing in a calcareous soil amended with sewage sludge. **Bioresource Technology**, v.97, p.545-552, 2006.

PASCALICCHIO, A. E. **Contaminação por metais pesados**. São Paulo, Ed. Annablume, 2002, 132p.

PAUL, C.; RHIND, S. M.; KYLE, C. E.; SCOTT, H.; McKINNEL, C.; SHARPE, R. M. Cellular and hormonal disruption of fetal testis development in sheep reared on pasture treated with sewage sludge. **Environmental Health Perspectives**, v.113, n.11, p.1580-1587, 2005.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry**: Theoretical and Applied. 4th ed., London: J&A. Churchill, v.2, 1985. 998p.

PETERSEN, H.; LUXTON, M. A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. **Oikos**, v.39, n.3, p.291-357, 1982.

PIRES, M.G.; NASCIMENTO, P.M. FEC pesquisa uso de lodo de esgoto como fertilizante. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/saladeimprensa>>, 2003. Acessado em 28/01/2008.

ROBERTS, R.D.; JOHNSON, M.S. Dispersal of heavy metals from abandoned mine workings and their transference through terrestrial food chains. **Environ. Pollut.**, v.16, p.293-310, 1978.

ROMELL, L. S. An example of Myriapods as mull formers. **Ecology**, v.16, n.1, p.67-71, 1935.

RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D.; FOX, R.S. **Zoologia dos Invertebrados**: Uma Abordagem Funcional-evolutiva. 7^a ed, Editora Roca LTDA, São Paulo (SP), 2005, 1146p.

SCHUBART, O. Os miriápodos e suas relações com a agricultura. **Pap. Avul. Dep. Zool.**, v.2, n.16, p.205-234, 1942.

SOPPER, W. E. Municipal Sludge Use in Land Reclamation. **Lewis Publishers**, Boca Raton, 1993.

STAMATIADIS, S.; DORAN, J. W.; KETTLER, T. Field and laboratory evaluation of soil quality changes resulting from injection of liquid sewage sludge. **Applied Soil and Ecology**, v.12, p.263-272, 1999.

STEINHAUS, E. A. B. **Principles of insect pathology**. Ed. McGraw-Hill, New York (USA), 1949, 757p.

SUNDERMAN JR, F. W. Recent advances in metal carcinogenesis. **Annual Clinical Laboratory Science**, [S.I.], v.14, p.93-122, 1984.

TAIRA, J.; ARAKAKI, K. Secretions of *Chamberlinis hualienensis* Wang (Polydesmida: Paradoxosomatidae) during the reproductive migration stage. **Appl. Entomol. Zool.**, v.37, p.621-624, 2002.

TAIRA, J.; NAKAMURA, K.; HIGA, Y. Identification of secretory compounds from the millipede *Oxidus gracilis* (C.L. Koch) (Polydesmida: Paradoxosomatidae) and their variation in different habitats. **Appl. Entomol. Zool.**, v.38, p.401-404, 2003.

TAN, K.H. **Environmental soil science**. 2.ed. Nova York, Marcel Dekker, 2000. 480p.

TORSVIK, V.; DAAE, F. L.; SANDAA, R. A.; VEREAS, L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, v.64, p.53-62, 1998.

TRAJANO, E.; GOLOVATCH, S. I., GEOFFROY, J. J.; PINTO-DA-ROCHA, R.; FONTANETTI, C. S. Synopsis of Brazilian cavedwelling millipedes (Diplopoda). **Pap. Avul. Zool.**, SP, v.41, n.18, p.259-287, 2000.

TRIEBSKORN, R.; HENDERSON, I.F.; MARTIN, A.P. Detection of iron in tissues from slugs (*Deroceras reticulatum* Müller) after ingestion of iron chelates by means of energy-filtering transmission electron microscopy (EFTEM). **Pestic. Sci.**, v.55, p.55-61, 1999.

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

TRIEBSKORN, R.; KÜNST, C. Ultrastructural change in the digestive system of *Deroceras reticulatum* (Mollusca: Gastropoda) induced by lethal and sublethal concentrations of the carbamate molluscicide cloethocarb. **Malacologia**, v.32, n.1, p.89-106, 1990.

TSUTIYA, M. T. Alternativas de disposição final de biossólidos. In: TSUTIYA, M. T.; COMPARINI, J. B.; SOBRINHO, P. A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P. C. T.; MELFI, A. J.; MELO, W. J. & MARQUES, M. O., eds. **Biossólidos na agricultura**. São Paulo, SABESP, 2001. 468p.

VANDENBULCKE, F.; GRELLE, C.; FABRE, M. C.; DESCAMPS, M. Implication of the midgut of the centipede *Lithobius forficatus* in the heavy metal detoxification process. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.41, p.258-268, 1998.

VIEIRA, R.F.; SILVA, C.M.M.S. Utilização do lodo de esgoto como fonte de fósforo na cultura de soja. **EMBRAPA**. Circular Técnica-6, Jaguariúna-SP, junho, 2004.

VINCENT, A. J., CRITCHLEY, R. F. A review of sewage sludge treatment and disposal in Europe. In: BRUCE, A. (ed) Sewage sludge stabilization and disinfection. Chichester U.K., p.550-580, 1984.

Rio Claro, 09 de Dezembro de 2010

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'B' with a horizontal line crossing it, and a long, sweeping line extending upwards and to the right.

Aluno: Vlamir Bozzatto de Oliveira

A handwritten signature in blue ink, featuring a large, stylized 'C' with a horizontal line crossing it, and a long, sweeping line extending upwards and to the right.

Orientadora: Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti