
Ciências Biológicas

Raphael Bastão de Souza

Análise do corpo gorduroso do diplópodo *Rhinocricus padbergi* para verificação de seu potencial bioindicador de solos impactados



Rio Claro
2009

RAPHAEL BASTÃO DE SOUZA

ANÁLISE DO CORPO GORDUROSO DO
DIPLÓPODO *Rhinocricus padbergi* PARA
VERIFICAÇÃO DE SEU POTENCIAL
BIOINDICADOR DE SOLOS IMPACTADOS

Orientadora: Prof^ª Dr^ª CARMEM S. 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 em Ciências
Biológicas

Rio Claro
2009

574.82 Souza, Raphael Bastão
S726a Análise do corpo gorduroso do diplópodo *Rhinoericus padbergi* para verificação seu potencial bioindicador de solos impactados / Raphael Bastão de Souza. - Rio Claro : [s.n.], 2009

18 f. : il., fots.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências

Orientador: Carmem S. Fontanetti Christofolletti

1. Histologia. 2. Milípede. 3. Lodo de esgoto. 4. ETE. 5. Histoquímica. I. Título.

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

“A grandeza de um ser humano não está no quanto ele sabe, mas no quanto ele tem consciência que não sabe.”

(Augusto Cury)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço meus pais por sempre colocarem minha educação (e da irmã) em primeiro lugar e, assim, tornar realidade este tão esperado momento: a conclusão do curso que escolhi seguir por toda minha vida! Também agradeço por todo o apoio durante estes quatro anos que estive fora de casa. Sem vocês nada disso seria possível.

Um agradecimento especial a minha orientadora, Carmem, que mesmo ocupada, sempre se mostrou atenciosa e dedicada comigo. Obrigado por fazer parte da minha graduação e por ter me ensinado tantas coisas.

Obrigado ao CNPq pela bolsa concedida e ao Gerson, responsável por muitas risadas durante as intermináveis horas no laboratório e pela ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho. Larissa e Vlamir, obrigado pelo companheirismo durante todo o período de estágio!

Bruno (Bivis), Raphael (Bats), Lucas (Carmo) e Danilo pela amizade de tantos anos. Desde o ensino fundamental até agora, o término de nossas faculdades.

Agradeço minha turma - Biologia Integral 2006 – por dividirem comigo estes quatro anos. Muita coisa mudou desde nosso primeiro ano, certamente o melhor para todos nós, mas as mudanças foram necessárias para cada um tomar seu caminho na vida. Também foram necessárias para fortalecer nossas amizades e, hoje, sei que posso dizer que tenho grandes amigos na turma.

Agradeço ao Túlio (Batata) e ao Lucas (Bigod) pelos dois anos e meio de convivência na mesma casa. Mesmo todos achando que não daríamos certo morando juntos, fomos a república da sala que durou por mais tempo.

Bruno, Luíza, Cíntia e Andréia. Nunca vou esquecer-me do melhor grupo de trabalhos e relatórios. Sempre juntos, sempre práticos e sempre eficientes!!!

Obrigado Vlamir, Yuji (Naruto) e Murilo (Argentino) por me aceitarem em sua casa. Obrigado especial ao Vlamir, que sempre esteve próximo em todos os momentos, difíceis, de alegria, de raiva, me fazendo esquecer dos problemas e me fazendo rir. Obrigado por tudo!!!

Obrigado Aline, pelas palavras certas nas horas certas. Obrigado Carol (Coró) pela alegria contagiante de todos os dias. Cris, obrigado pelos momentos em que eu “estava estressado e ia para sua casa espairer”. Não só por estes momentos, mas por todos os que eu pude contar com sua ajuda e amizade, seja nas horas de estresse, seja nas horas de curtir a balada, de estudar para as provas. Muito bom saber que sempre posso contar com você.

Lari, obrigado por ser minha Prima Pobre e por me agüentar por tanto tempo. Acho que nós nunca vamos nos esquecer do “Não sei por que, mas ainda goooosto você”. Patty, mesmo tendo nos trocado por outra faculdade, obrigado pela amizade nos dois primeiros anos.

Muito obrigado Carol Parga! Muito obrigado mesmo, afinal sei que sou um amigo que dá um certo trabalho! Você sabe o quanto sua amizade foi e é importante

para mim. Obrigado por sempre estar disposta a me ouvir e me apoiar em todas as situações. Nunca vou esquecer dos momentos que passamos juntos!

Obrigado ao meu “irmão” rio clarense, Fábio (Quase Nada). Obrigado por ser a pessoa que admiro e por ter me ajudado a crescer como pessoa nesses anos. Agradeço por todas as conversas, momentos de compreensão (e incompreensão) que fizeram parte da nossa amizade!

Por fim, gostaria de dizer que mesmo que eu não gostasse de Biologia, teria valido a pena passar esses quatro anos de faculdade em Rio Claro por ter convivido com os melhores amigos que alguém pode ter.

MUITO OBRIGADO A TODOS!!!

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1 A Classe Diplopoda.....	9
2.2 Corpo Gorduroso.....	11
2.3 Diplópodos como bioindicadores.....	12
2.4 Lodo de Esgoto.....	13
3. OBJETIVOS.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 Material.....	15
4.2 Métodos.....	15
4.3 Histologia.....	16
4.4 Histoquímica.....	16
5. RESULTADOS.....	17
5.1 Histologia.....	17
5.1.1 Corpo Gorduroso Perivisceral.....	17
5.1.2 Corpo Gorduroso Parietal.....	18
5.2 Histoquímica.....	18
5.2.1 Corpo Gorduroso Perivisceral.....	18
5.2.2 Corpo Gorduroso Parietal.....	19
6. DISCUSSÃO.....	19
7. CONCLUSÕES.....	24
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, os despejos líquidos (esgotos) domésticos e industriais são os principais responsáveis pela poluição de mananciais hídricos que abastecem as médias e grandes cidades brasileiras. O agravamento da escassez de água potável e o aumento da conscientização ambiental da população têm pressionado as autoridades públicas à busca de soluções para recuperar a qualidade desses mananciais, dentre elas a construção de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs). A ETE, se, por um lado, contribui para alcançar aquela finalidade, em contrapartida, gera um resíduo denominado lodo de esgoto, que necessita de disposição final adequada (MARTINS et al., 2003).

Uma das alternativas de disposição final do lodo é o aproveitamento agrícola (GOMES et al., 2005) e sua utilização na recuperação da estrutura física dos solos degradados (KOCSSIS; DE MARIA, 2004), já que suas propriedades são semelhantes às de outros produtos orgânicos comumente usados na agricultura, como os esterco suíno, bovino e avícola (BARBOSA et al., 2005).

O lodo provém de ETEs, as quais realizam os tratamentos primários e secundários. Tais tratamentos são eficientes apenas na remoção da matéria orgânica biodegradável, não removendo os nutrientes existentes neste esgoto (CETESB, 2004). Entretanto, esse resíduo só pode ser utilizado na agricultura se estiver dentro de padrões mínimos exigidos pelos órgãos ambientais quanto à presença de metais e patógenos humanos, entre outros (DE CAMARGO et al., 2008; CONAMA, 2006).

O lodo estritamente urbano apresenta baixa quantidade de metais, mas, quando esgotos industriais e água de chuva entram no sistema de captação de esgoto, este pode ter sua concentração de metais significativamente aumentada. Assim sendo, concentrações elevadas de diferentes metais representam risco potencial ao meio ambiente e à saúde pública, como resultado da acumulação destes no solo (ATSDR, 1997). Os metais contidos no lodo podem ser absorvidos pelos tecidos de plantas e animais e, conseqüentemente, acumular-se na cadeia alimentar, comprometendo a saúde humana e animal

Recentemente, tem havido um crescente interesse no uso de bioindicadores para a avaliação dos efeitos adversos de substâncias químicas no solo, sendo que invertebrados terrestres têm sido usados por ecotoxicologistas para documentar e quantificar a exposição e os efeitos de poluentes no meio ambiente (KAMMENGA et al., 2000).

Devido aos seus hábitos nas camadas superiores do solo, invertebrados da fauna saprófaga como Isopoda, Diplopoda e Collembola estão regularmente expostos a metais.

Distribuídos pela atividade humana ou derivados de fontes antropogênicas, como esgoto ou gases, eles podem exceder os níveis de tolerância fisiológica do ambiente, alimento e órgãos destes animais. Por essa razão, estes invertebrados não necessitam apenas desenvolver mecanismos para a absorção, armazenamento e excreção, mas, também, necessitam conciliar a absorção dos metais essenciais e nocivos com propriedades físicoquímicas semelhantes. Por este motivo, os invertebrados saprófagos estão entre os organismos mais adequados para estudos citológicos e bioquímicos do metabolismo de metais; muitos trabalhos sobre os efeitos tóxicos dos metais nesses grupos têm focado no acúmulo destes em relação à sobrevivência e reprodução dos mesmos (KÖHLER, 2002).

Diplópodos, de modo geral, são reconhecidamente resistentes a diversas substâncias químicas e, quando em contato com substâncias tóxicas, muitas vezes preferem morrer de inanição a ingerir alimentos contaminados. Por este comportamento, alguns pesquisadores têm discutido a possibilidade de seu uso como bioindicadores na toxicidade do solo, utilizando o corpo gorduroso e também o tubo digestivo (HOPKIN et al., 1985; TRIEBSKORN et al., 1991; KÖHLER; TRIEBSKORN, 1998).

O corpo gorduroso de milípedes tem como função primária o armazenamento de lipídios, glicogênio, proteína e ácido úrico, além de ser um permanente local de armazenamento de substâncias a serem excretadas (HOPKIN; READ, 1992).

Em contraste com a importância ecológica de artrópodos invertebrados saprófagos do solo, o conhecimento da ação citológica de metais em Diplopoda é escasso (KÖHLER, 2002). Devido a esse fato e ao exposto acima, este projeto teve a finalidade de analisar os possíveis efeitos tóxicos causados pela exposição ao lodo de esgoto em espécimens de *Rhinocricus padbergi*. A espécie foi escolhida devido sua abundância na região e pelo histórico de trabalhos desenvolvidos com a mesma pela equipe proponente do projeto (CAMARGO-MATHIAS et al., 1998; 2004; FANTAZZINI et al., 1998; 2002; CAMARGO-MATHIAS; FONTANETTI, 2000; ARAB et al., 2003; FONTANETTI; CAMARGO-MATHIAS, 2004; MIYOSHI et al., 2005; FONTANETTI et al., 2004; 2006).

O projeto está vinculado a uma proposta da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) sobre “Caracterização de Lodos de ETES” para sua caracterização toxicológica. Através destes testes toxicológicos será possível o desenvolvimento de matrizes de decisão que visam diminuir os custos e aumentar a confiabilidade dos lodos gerados pelas ETES.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Classe Diplopoda

Milípedes, popularmente conhecidos no Brasil como piolho-de-cobra, emboá ou gongolô, constituem uma classe de Myriapoda (Diplopoda) e possuem uma distribuição cosmopolita, sendo abundantes, principalmente, nos trópicos. Uma característica distinguível dos membros dessa classe é a presença de segmentos duplos, portando dois pares de pernas. Milípedes são animais predominantemente noturnos que se protegem do sol vivendo sob rochas ou troncos de árvores, com poucas espécies sendo comensalistas em ninhos de formigas e cupins. Este grupo compõe a terceira maior classe de Arthropoda, com estimativa de 80.000 espécies, perdendo em diversidade apenas para as classes Insecta e Arachnida (GOLOVATCH, 1997).

Os diplópodos possuem um importante papel na dinâmica dos solos, onde ocupam o nível trófico de decompositores, por promover sua aeração e seu enriquecimento. Sua alimentação é composta por detritos, matéria orgânica em decomposição, frutas, musgos e relativa quantidade de matéria mineral do solo (SCHUBART, 1942).

Seus hábitos são predominantemente noturnos, evitando a exposição ao sol e ao calor, exceto em condições de alagamento do solo devido às chuvas de verão ou quando migram para lugares alternativos de sobrevivência. São típicos de habitats úmidos e com grande disponibilidade de material orgânico, sendo geralmente encontrados nos lugares sombrios das matas, vivendo sob folhas caídas, cascas e troncos apodrecidos. Muitos habitam galerias deixadas por outros animais, como minhocas, outros são cavernícolas, e ainda existem aqueles que podem ser considerados como uma fauna sinantrópica (SCHUBART, 1947). Os diplópodos com caráter sinantrópico são os que vivem na dependência direta do homem, vivendo em hortas, quintais, estufas, pomares, e até mesmo nas próprias casas, alimentando-se de detritos do lixo doméstico.

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 certos ordens, o número de segmentos é constante, porém em outras pode variar de acordo com a idade e sexo.

Possuem poucos ou nenhum inimigo natural (RUPERT; BARNES, 2005). A presença de poro repugnatório em determinados segmentos é característica da grande maioria das ordens, havendo raras exceções. Esse poro corresponde à abertura da glândula repugnatória, produtora de secreção que contém basicamente cianeto e iodo, com cheiro forte e desagradável, repelindo predadores (SCHUBART, 1942). De acordo com Nakamura et al.

(2005) o conteúdo e a 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.

Acidentes com seres humanos são raros, acontecendo a maioria com crianças e manifestando-se por eritema, vesículas, bolhas e exulcerações, além de hiperpigmentação local (HADDAD JÚNIOR et al., 2000). Uma vez em contato com a pele humana os líquidos e vapores expelidos podem provocar sensação de ardência, lembrando uma queimadura leve (RADFORD, 1975). Contatos prolongados com o animal (preso nas roupas, por exemplo) podem levar à lesões mais severas, com formação de vesículas, bolhas e exulcerações (HADDAD JÚNIOR et al., 2000).

Por serem detritívoros, alguns milípedes podem se tornar importantes pragas agrícolas e causar prejuízos (BRÉVAULT et al., 2005). Ebreget et al. (2004) conduziram um estudo em Uganda, África, para estabelecer a relação dos milípedes com os danos causados em plantações de batata-doce. Foram entrevistados 148 produtores e, segundo seus relatos, problemas causados por milípedes na região foram significativos. Os autores observaram que, frequentemente, os efeitos causados pelos milípedes foram confundidos como sendo causados por outras pragas, como besouros, e que faltavam conhecimentos para reduzir os danos.

Relatos sobre migração, infestação e danos causados por milípedes têm ocorrido em várias partes do mundo (CLOUDSLEY-THOMPSON, 1949; NIJIMA; SHINOHARA, 1988; UMEH et al., 2001; BOCCARDO et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2002; INYANG; NDON, 2003). No Brasil, a partir da década de 1990, foi observada uma expansão na população de *Plusioporus setiger* (Broelemann, 1901) (Spirostreptida: Spirostreptidae) em plantações de café na região de Alto Paranaíba, Minas Gerais. O fenômeno foi atribuído ao uso de fertilizantes orgânicos, à irrigação e ao uso de pesticidas (BOCCARDO et al., 1997).

Apesar de não apresentarem população numerosa, podem ocorrer explosões populacionais causadas por desequilíbrios no meio ambiente, mudanças climáticas, utilização de pesticidas que podem eliminar possíveis competidores e presença de depósitos de lixo oriundos da poda de árvores e mato. Recentemente, Fontanetti et al. (2007) relataram uma infestação na cidade de Campinas, SP, causada pela espécie *Urostreptus atrobrunneus*.

2.2 Corpo Gorduroso

O corpo gorduroso de milípedes consiste em um tecido difuso distribuído por toda cavidade corpórea do animal. Tem como função primária o armazenamento de lipídios, glicogênio, proteína e ácido úrico, além de ser um permanente local de armazenamento de substâncias a serem excretadas (HOPKIN; READ, 1992). Segundo Hubert (1974; 1975; 1979), as células do corpo gorduroso possuem uma variedade de grânulos contendo metais ou urato de potássio.

Pesquisas realizadas por Fontanetti et al. (2004), demonstraram que o corpo gorduroso de diplópodos é distribuído em duas áreas: uma camada periférica, que recobre internamente todo o corpo do animal, aderido firmemente ao tegumento, designado corpo gorduroso parietal; e um tecido que preenche as cavidades do corpo e envolve diferentes órgãos, como o trato digestivo, chamado de corpo gorduroso perivisceral.

Em geral, o corpo gorduroso de *R. padbergi* apresenta uma aparência esbranquiçada, com células dispostas em fileiras, os adipócitos (FONTANETTI et al., 2004). Antigamente, acreditava-se que o corpo gorduroso dos milípedes era constituído, em geral, por apenas um tipo celular, os adipócitos (HUBERT, 1974). Estudos realizados por Camargo-Mathias e Fontanetti (2000) revelaram que, além dos adipócitos, o corpo gorduroso de milípedes possui um segundo tipo celular similar aos enócitos descritos em algumas espécies de insetos.

Aspectos morfológicos dos enócitos indicam que possuem uma grande capacidade em absorver substâncias da hemolinfa através de invaginações de sua membrana. O desenvolvimento do retículo endoplasmático liso dessas células sugere que estão, principalmente, envolvidas com o metabolismo de lipídios. Porém, em *R. padbergi*, análises ultra-estruturais indicam que estão envolvidas com a síntese e armazenamento de proteínas, ao invés de lipídios (CAMARGO-MATHIAS; FONTANETTI, 2000).

Os adipócitos são células atingidas por um incontável número de traquéias, sugerindo uma alta taxa de atividade metabólica. Possuem citoplasma com grande quantidade de material armazenado, de composição variada, incluindo muitos vacúolos (FONTANETTI et al., 2004). Nos adipócitos presentes no corpo gorduroso parietal, estruturas lisossomais são freqüentemente encontradas, sugerindo uma atividade secretora ou de eliminação de células através do processo de apoptose (CAMARGO-MATHIAS; FONTANETTI, 2000).

2.3 Diplópodos como bioindicadores

Para avaliar a poluição de ambientes terrestres e aquáticos e suas possíveis conseqüências para os organismos destes ecossistemas, ecotoxicologistas estabeleceram biomarcadores e bioindicadores capazes de informar os efeitos adversos causados por substâncias tóxicas em invertebrados e vertebrados (KAMMENGA et al., 2000).

Recentemente, tem havido um crescente interesse no uso de bioindicadores para a avaliação dos efeitos causados por substâncias químicas no solo. Neste sentido, invertebrados terrestres oferecem uma alternativa significativa, uma vez que possuem um papel importante na dinâmica dos solos. Além disso, os invertebrados representam o principal grupo de organismos do solo, estando presentes em grande densidade; as questões éticas acerca do seu uso são menores em relação aos dos vertebrados e estão em contato direto com o solo, diferentemente dos vertebrados, expostos indiretamente através da cadeia alimentar (KAMMENGA et al., 2000).

Diplópodos, de modo geral, são reconhecidamente resistentes a diversas substâncias químicas e quando em contato com substâncias tóxicas, muitas vezes preferem morrer de inanição a ingerir alimentos contaminados. Por este comportamento, alguns pesquisadores têm discutido a possibilidade de seu uso como bioindicadores na toxicidade do solo, utilizando o corpo gorduroso e também o tubo digestivo (HOPKIN et al., 1985; TRIEBSKORN et al., 1991; KÖHLER; TRIEBSKORN, 1998).

Assim como outros animais saprófagos, o principal papel ecológico dos diplópodos é promover a decomposição de matéria orgânica morta, sendo extremamente afetados por metais. Apesar do número de espécies de diplópodos diminuir em áreas contaminadas por metais (HOPKIN et al., 1985), algumas espécies são capazes de suportar este ambiente e lidar com esses compostos tóxicos.

Na maioria dos invertebrados do solo, os metais são seletivamente concentrados em um ou poucos órgãos, ou então em partes específicas de um tecido (DALLINGER, 1992). Os diplópodos podem metabolizar e/ou acumular vários tipos de metais, principalmente no intestino médio e no corpo gorduroso (KÖHLER et al., 1995).

Apesar da importância ecológica, poucos estudos têm sido realizados para examinar as estratégias de sobrevivência e destoxificação dos milípedes em função dos metais presentes no ambiente (FONTANETTI et al., 2006).

2.4 Lodo de Esgoto

Até meados do século XIX, o destino dos efluentes domésticos não era um grande motivo de preocupação para a população e autoridades competentes. Este fato, associado com o desconhecimento da microbiologia, levou à ocorrência das grandes epidemias na Europa entre os séculos XVI e XIX, como a cólera, por exemplo. O quadro passou a agravar-se com o crescimento da população e com o surgimento de aglomerados urbanos em algumas cidades (SAWYER; McCARTY, 1978), o que acarretou no aumento acelerado dos problemas de saúde pública.

Um dos principais problemas que qualquer cidade enfrenta é o da coleta e tratamento dos resíduos por ela gerados. Quanto maior o número de pessoas que vivem em uma determinada cidade, maior será a sua geração de resíduos. Cada resíduo possui características específicas, que levam à necessidade de diferentes formas de coleta, tratamento e disposição. Na maioria dos casos, o volume de resíduos gerados supera, em muito, a capacidade natural de assimilação do meio que circunda esses centros urbanos. O resultado é a crescente deterioração das condições ambientais com o aumento visível dos níveis de poluição. De fato, na maioria dos grandes centros urbanos existem claras evidências de queda na qualidade do ar, dos corpos hídricos, da fauna e da flora (ROCHA; SHIROTA, 1999).

Atualmente, os despejos líquidos (esgotos) domésticos e industriais são os principais responsáveis pela poluição de mananciais hídricos que abastecem as médias e grandes cidades brasileiras. O agravamento da escassez de água potável e o aumento da conscientização ambiental da população têm pressionado as autoridades públicas à busca de soluções para recuperar a qualidade desses mananciais, dentre elas a construção de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs). A ETE, se, por um lado, contribui para alcançar aquela finalidade, em contrapartida, gera um resíduo denominado lodo de esgoto, que necessita de disposição final adequada (MARTINS et al., 2003).

Lodo de esgoto é uma denominação genérica para o resíduo sólido gerado pelos sistemas de tratamento de águas residuárias. Trata-se de um material heterogêneo, cuja composição depende do tipo de tratamento empregado para purificar o esgoto e das características das fontes geradoras (população e indústrias).

Entre as alternativas para sua disposição final estão seu aproveitamento agrícola (GOMES et al., 2005), sua utilização na recuperação da estrutura física dos solos degradados (KOCSSIS; DE MARIA, 2004), aterros sanitários, incineração e disposição no mar, sendo que algumas destas alternativas são questionadas do ponto de vista econômico e ambiental (ROCHA; SHIROTA, 1999).

Segundo Boeira et al. (2002), o lodo de esgoto utilizado para fins agrícolas pode atuar como condicionador de solo, por sua elevada carga de matéria orgânica, além de promover a reciclagem de nutrientes. Ele também tem um grande potencial como fertilizante orgânico, contendo alguns elementos essenciais às plantas, tais como: N, P, Ca, Mg, S e micronutrientes (MELO et al., 1994). Do ponto de vista econômico, a substituição de fertilizantes químicos pelo lodo de esgoto geraria rendimentos equivalentes ou até maiores, reduzindo os custos, uma vez que haveria o reaproveitamento integral dos nutrientes (VIEIRA; SILVA, 2004). Porém, isso deve ser tratado com cautela, pois com relação ao teor de nutrientes, tais como nitrogênio, fósforo e potássio, o lodo de esgoto é menos rico quando comparado ao fertilizante comercial (KITAMURA, 2006).

O lodo de esgoto pode apresentar em sua composição elementos químicos e biológicos indesejáveis do ponto de vista ambiental, ou seja, pode conter elementos que, em contato com o homem e/ou com a fauna e a flora, podem causar doenças e contaminações diversas. Portanto, qualquer decisão sobre o destino final mais apropriado para o lodo de esgoto depende da avaliação e minimização dos riscos de contaminação do ambiente e do homem. Vários são esses elementos, os quais podem ser classificados em dois grandes grupos: contaminantes químicos (metais e componentes químicos orgânicos) e contaminantes biológicos (patógenos) (ROCHA; SHIROTA, 1999).

Os metais contidos no lodo de esgoto podem ser absorvidos pelos tecidos de plantas e animais e, conseqüentemente, acumular-se na cadeia alimentar, comprometendo a saúde humana e animal (ATSDR, 1997). São capazes de provocar danos às células, apresentando vários mecanismos de ação. Os mecanismos de ação mais comumente observados são alterações imunossupressoras; competição de co-fatores de atividade enzimática em sítios específicos; inibição de enzimas vitais como as da fosforilação oxidativa e alteração das estruturas celulares, principalmente na porção lipoprotéica de membrana (PASCALICCHIO, 2002). Alguns metais induzem, comprovadamente, a formação de tumores em organismos experimentais e em seres humanos eventualmente expostos (SUNDERMAN, 1984).

O lodo estritamente urbano apresenta baixa quantidade de metais mas, quando esgotos industriais e água de chuva entram no sistema de captação de esgoto, este pode ter sua concentração de metais significativamente aumentada. Assim sendo, concentrações elevadas de diferentes metais representam risco potencial ao meio ambiente e à saúde pública, como resultado da acumulação destes no solo (ATSDR, 1997).

Portanto, a definição de políticas para a reciclagem agrícola do lodo de esgoto deve ser baseada em cuidadosos estudos que definam critérios agronômicos, ambientais e sanitários, de modo a garantir sua utilização segura (ANDREOLI et al., 1998).

3. OBJETIVOS

Este projeto teve por finalidade:

1. Expor espécimens de *Rhinocricus padbergi* em substrato contendo lodo de esgoto, a fim de analisar seu comportamento e sobrevivência.
2. Coletar o corpo gorduroso desses animais para posterior análise histológica para a verificação de possíveis alterações morfológicas.
3. Realizar testes histoquímicos a fim de detectar proteínas, cálcio, lipídios e carboidratos e, assim, analisar possíveis alterações na produção de algum elemento, o qual possa significar determinadas alterações fisiológicas e/ou morfológicas.
4. Verificar a eficiência destes animais em ensaios de biomonitoramento.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 Material:

Os exemplares de *Rhinocricus padbergi* foram coletados manualmente na cidade de Rio Claro, SP, onde a espécie é abundante. Os espécimens foram levados ao laboratório, onde ficaram aclimatados em terra oriunda do local de coleta por 15 dias, a temperatura de 21° C.

Após este período, foram montados quatro bioensaios com 15 animais cada um. Destes quatro bioensaios, um foi utilizado como controle, contendo apenas substrato do local de coleta dos animais. Os três bioensaios restantes continham lodo de esgoto, proveniente de ETE, em diferentes concentrações, 1%, 10% e 50%, misturado na mesma terra do controle.

Os animais foram expostos por um período de 7, 15 e 90 dias, com a finalidade de analisar respostas aguda e subcrônica. Durante esse período, os animais também foram monitorados, a fim de analisar seu comportamento.

4.2 Métodos:

Após cada período de exposição, os diplópodos foram anestesiados e dissecados em solução fisiológica para a retirada do corpo gorduroso, tanto parietal quanto perivisceral. O

material recolhido foi fixado em formolcálcio 10% e Carnoy por 24 horas; posteriormente foi colocado em solução tampão fosfato de sódio pH=7,4 durante 24 horas e mantido em geladeira.

Após cada período de exposição ao lodo, quatro animais foram dissecados de cada bioensaio, seguindo o protocolo proposto por Köhler e Triebkorn (1998) em estudo realizado com invertebrados em bioensaios, incluindo um diplópodo.

4.3 Histologia:

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

Após esse processo, o material foi colocado em moldes contendo resina com catalisador. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados com auxílio do micrótomo Leica RM2245. Os cortes obtidos foram hidratados e recolhidos em lâminas. Depois de secas, as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina, conforme rotina histológica, para posterior observação, análise 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 Carnoy 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 (segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

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

d. Lipídios

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

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

5. RESULTADOS

5.1 Histologia

5.1.1 Corpo Gorduroso Perivisceral

O corpo gorduroso do grupo controle exposto por sete dias apresentou o padrão descrito por Fontanetti et al. (2004). Suas células, os adipócitos, estão dispostas em fileiras, onde chegam um grande número de traqueríolas. Juntamente com os adipócitos, são encontradas células menores, com formato elíptico ou ovalado, chamadas enócitos (Figura 1). Os adipócitos em *R. padbergi* são grandes, com limites bem definidos e núcleo esférico localizado em diferentes posições. O citoplasma apresenta grande quantidade de estruturas circulares concêntricas, chamadas esferocristais (setas na figura 1), os quais podem ser arrancados durante a microtomia. O grupo exposto ao lodo com concentração em 1% apresentaram as células do corpo gorduroso íntegras. Os espécimens expostos ao lodo com concentração em 10% apresentaram células íntegras, porém com aumento na quantidade de esferocristais no citoplasma. No grupo exposto ao lodo com concentração em 50% algumas células apresentaram desorganização citoplasmática, com perda do limite celular (ponta de seta na figura 2); houve também aumento no número de esferocristais.

O grupo controle no bioensaio de exposição por 15 dias apresentou o padrão descrito para a espécie. O exposto ao lodo com concentração em 1% apresentou células semelhantes ao grupo controle, porém com um pequeno aumento no número de esferocristais. O grupo exposto ao lodo com concentração em 10% apresentou algumas regiões em que as células

sofreram degradação citoplasmática, aumento no número de esferocristais e deformação de grande parte dos núcleos (Figura 3). Os espécimens do grupo exposto ao lodo com concentração em 50% apresentaram células com as mesmas alterações encontradas no grupo exposto ao lodo com concentração em 10%.

Na exposição por noventa dias, o grupo controle apresentou o corpo gorduroso conforme o descrito para a espécie. O bioensaio com concentração em 1% apresentou indivíduos com corpo gorduroso com alta taxa de degradação do citoplasma, com evidente perda do limite celular. A maioria dos núcleos apresentaram-se deformados e picnóticos (Figura 4). Os animais dos bioensaios com concentração em 10% e 50% não sobreviveram até o final do período de exposição.

5.1.2. Corpo Gorduroso Parietal

O corpo gorduroso parietal apresenta a mesma morfologia do corpo gorduroso perivisceral (FONTANETTI et al., 2004). Tanto o grupo controle quanto os grupos expostos ao lodo de esgoto em todos os períodos não apresentaram alterações nas células do corpo gorduroso.

5.2 Histoquímica

5.2.1 Corpo Gorduroso Perivisceral

A análise histoquímica do grupo controle de sete dias de exposição demonstrou quantidades consideráveis de proteínas distribuídas pelo citoplasma das células do corpo gorduroso (Figura 5). As estruturas circulares, esferocristais, apresentaram-se fracamente positivas ao teste para proteínas. O teste para polissacarídeos neutros revelou grande quantidade deste elemento em algumas regiões do citoplasma da célula (Figura 6). Os esferocristais apresentaram-se com o centro moderadamente corado por esta técnica, com anéis a sua volta negativamente corados. Cálcio (Figura 7) e lipídio (Figura 8) foram detectados no citoplasma das células distribuídos como grânulos. O grupo exposto ao lodo com concentração em 1% apresentou padrão de proteínas semelhante ao grupo controle; o teste para polissacarídeos revelou diminuição na quantidade do mesmo; não houve alterações significativas na detecção de lipídios e de cálcio. O grupo exposto ao lodo com concentração em 10% apresentou uma notável redução na quantidade de polissacarídeos neutros, os quais ficaram confinados em poucas regiões do citoplasma da célula; não houve alterações significativas na detecção de lipídios, cálcio e proteínas. No bioensaio exposto ao lodo com

concentração em 50% o corpo gorduroso apresentou redução na quantidade de proteínas no citoplasma e os esferocristais apresentaram-se totalmente negativos para o mesmo; o teste para detecção de polissacarídeos neutros revelou redução destes elementos (Figura 9); não houve alterações significativas na detecção de lipídios e de cálcio.

O grupo controle na exposição por quinze dias apresentou o mesmo padrão encontrado no grupo controle da exposição de sete dias. Nos espécimens expostos ao lodo com concentração em 1% foi observado o mesmo padrão do grupo controle em relação à detecção de proteínas; o teste para detecção de polissacarídeos neutros revelou diminuição na quantidade do mesmo; foi detectado pequeno aumento na quantidade de cálcio em relação ao controle (Figura 10); não houve alteração na detecção de lipídio. No grupo exposto ao lodo com concentração em 10% houve diminuição na quantidade de proteínas nas células (Figura 11); as detecções para polissacarídeos neutros, cálcio e lipídios permaneceram como encontrado no grupo exposto ao lodo com concentração 1%. O grupo exposto ao lodo com concentração 50% apresentou diminuição na quantidade de proteínas e de polissacarídeos neutros; aumento na quantidade de grânulos de cálcio no citoplasma; não houve alteração na quantidade de lipídios.

A exposição por noventa dias apresentou o grupo controle semelhante aos grupos controles dos outros períodos de exposição; no bioensaio exposto ao lodo com concentração em 1% apresentou diminuição na quantidade de proteínas e polissacarídeos neutros no citoplasma das células; alguns esferocristais reagiram positivamente à técnica para detecção de cálcio, enquanto outros reagiram moderadamente (Figura 12).

5.2.2 Corpo Gorduroso Parietal

O corpo gorduroso parietal não apresentou alterações nas diferentes concentrações de lodo de esgoto nos diferentes períodos de exposição.

6. DISCUSSÃO

O lodo de esgoto é um material complexo, que resulta do processo de tratamento primário e secundário de esgoto e seu descarte é motivo de preocupação no mundo todo. Além de poluentes como microrganismos e metais, substâncias químicas sintéticas, provenientes de diversas fontes, podem estar presentes na solução ou podem ser sorvidas nos sólidos de lodo de esgoto. A ocorrência de poluentes orgânicos no lodo tem crescido em

virtude do aumento da produção de substâncias sintéticas, de diversas naturezas, pela indústria química (PARAÍBA; SAITO, 2005).

Invertebrados terrestres têm sido utilizados como bioindicadores de poluição ambiental causada por metais como o cádmio, cobre, chumbo e zinco, devido ao seu contato constante com os contaminantes do solo. O acúmulo de metais em vermes ou invertebrados que se alimentam deles tem sido comumente usado como parâmetro para a avaliação de risco ao meio ambiente (ROBERTS; JOHNSON, 1978; IRELAND, 1979; BEYER et al., 1985; HEIKENS et al., 2001).

Devido aos hábitos dos diplópodos, estes animais podem ser muito influenciados pela deposição de metais no solo. Enquanto algumas espécies de milípedes podem sofrer uma notável redução no número de seus representantes em áreas muito contaminadas (HOPKIN et al., 1985), outras apresentam estratégias de destoxificação do organismo (KÖHLER et al., 1995).

A espécie *R. padbergi* é conhecida por ser resistente a vários compostos químicos (FONTANETTI, comunicação pessoal). Neste estudo, a análise histológica revelou que as células do corpo gorduroso foram afetadas pelos possíveis contaminantes presentes na amostra de lodo de esgoto utilizado.

Para Beckett (1991), a toxidez devido ao metal para a planta e para o animal, deve ser acompanhada e, por isso, medida pelas seguintes variáveis: diminuição no crescimento ou redução na colheita, sintomas visíveis e concentração no tecido. O primeiro efeito ou manifestação pode ser devido à interferência provocada pelo elemento na absorção, transporte ou funções de outro. O sintoma visível, que poderá não ser específico, é o resultado de uma cadeia de acontecimentos que começa com uma alteração ao nível molecular, continua com modificação subcelular que, por sua vez, conduz a uma alteração celular a qual, finalmente, resulta em modificação no tecido, isto é, no sintoma.

Segundo Köhler et al., (1995) a absorção de metais ocorre, predominantemente, no intestino médio dos milípedes. O epitélio do trato digestivo destes animais é composto por uma camada de células em contato direto com o meio externo, garantindo uma primeira linha de defesa contra uma variedade de substâncias tóxicas. De todos os metais presentes no lúmen do intestino apenas uma parte é absorvida pelo epitélio, dependendo das condições ácidas do lúmen. Diplópodos também possuem um eficiente mecanismo de detoxificação de metais no intestino médio para evitar que esses contaminantes sejam distribuídos por todo o corpo.

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, como os metais, do lúmen para outros tecidos do corpo (HOPKIN et al., 1985).

No presente estudo, foi observada alterações morfológicas e fisiológicas apenas nas células do corpo gorduroso perivisceral, um tecido que recobre as cavidades do corpo e envolve diferentes órgãos, como o trato digestivo. Provavelmente, a barreira formada pelo intestino médio não foi suficiente para impedir que substâncias tóxicas chegassem a outras regiões do corpo do animal. Nos animais expostos ao lodo com concentração 1% de todos os períodos de exposição, o epitélio do intestino foi capaz de barrar as substâncias tóxicas provenientes do lodo, uma vez que as células do corpo gorduroso, tanto parietal quanto perivisceral, apresentaram-se íntegras. Porém, nos animais expostos a maiores concentrações do lodo, o epitélio não foi capaz de exercer a mesma função. Nos animais expostos ao lodo com concentração 10% no décimo quinto dia de exposição, o corpo gorduroso perivisceral apresentou regiões onde as células sofreram degradação citoplasmática, bem como células com núcleos deformados. O mesmo foi encontrado nos animais de noventa dias de exposição, porém, neste caso, praticamente a totalidade das células estavam com citoplasma degradado e com a maioria de seus núcleos deformados.

Porém, como já foi mencionado acima, as células do corpo gorduroso parietal não sofreram danos. Isto pode ter ocorrido devido a sua localização, uma camada periférica, que recobre internamente todo o corpo do animal, aderido firmemente ao tegumento. As substâncias tóxicas presentes no lodo, neste caso, teriam que ultrapassar duas “barreiras”, uma formada pelo trato digestório e outra formada pelos órgãos internos do organismo, revestidos pelo corpo gorduroso perivisceral.

Os metais provavelmente presentes no lodo agiram como substâncias estressantes para as células do corpo gorduroso perivisceral. Segundo Meyer e Silva (1999), células submetidas a estresse podem sobreviver ou morrer, na dependência do tipo celular, tipo e intensidade do estresse e de outros fatores. Como resultado deste estresse, as células podem sofrer necrose, um tipo de morte onde há aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e conseqüente ruptura celular (GRIVICICH, 2007). Conseqüentemente, ocorre a geração de uma resposta inflamatória, que pode causar injúria e até morte de células vizinhas, ou seja, nesta condição um grande número de células são afetadas e lesadas ao mesmo tempo e devido ao desencadeamento do processo inflamatório há alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (CURTIN et al., 2002).

Segundo Armani (2007), a necrose é um processo que ocorre quando o núcleo da célula é afetado. O agente lesivo afeta a célula primeiro com lesões reversíveis e, na persistência do agente, os danos chegam ao nível nuclear, causando lesões tidas como irreversíveis. Portanto, a necrose se caracteriza por danos no núcleo, e conseqüentes alterações estruturais da célula. Neste processo, um dos estágios do núcleo caracteriza-se pela picnose. Neste estudo, as possíveis substâncias tóxicas presentes no lodo podem ter agido como agente lesivo, ocasionando deformação do núcleo, bem como núcleos picnóticos.

Outra alteração aparente nas células foi o aumento do número de inclusões citoplasmáticas na forma de esferocristais. Foi observado que quanto maior a concentração de lodo a que o animal foi exposto e quanto maior o período de exposição, maior a quantidade de esferocristais encontrados nas células.

De acordo com Fontanetti et al. (2006), o acúmulo de minerais na forma de esferocristais é um mecanismo importante na manutenção da homeostase do organismo nestes animais. Tal acúmulo aparece em vários invertebrados e em diferentes órgãos, estando relacionado com o processo de balanço iônico, o qual envolve a reciclagem, estoque e excreção de minerais. De acordo com Hubert (1975), as inclusões ocorrem como esferocristais ou grânulos em Diplopoda.

Segundo Hopkin e Read (1992), os adipócitos incorporam uma variedade de grânulos que contém metais e são locais permanentes de estoque de substâncias desnecessárias. O aumento no número de esferocristais encontrados no citoplasma das células sugere que o lodo de esgoto possuía grande quantidade de substâncias desnecessárias para a espécie *R. padbergi*.

Os resultados aqui encontrados estão de acordo com os dados de Fontanetti et al. (2006) em relação à composição dos esferocristais. Segundo este estudo, os esferocristais são compostos predominantemente por cálcio e ácido úrico. Foi observado um aumento na bioacumulação de cálcio nos grupos expostos a maiores concentrações de lodo e períodos maiores. Além de presente nos esferocristais, cálcio também foi observado na forma de grânulos distribuídos pelo citoplasma. O grande número de esferocristais encontrados nas células de *R. padbergi* está relacionado com sua dieta, uma vez que revolvem solo rico em grande quantidade de metais. O aumento na quantidade de bioacumulação de cálcio nos esferocristais indica que o lodo possuía uma grande fonte deste elemento.

Segundo Fontanetti et al. (2006), uma das funções do corpo gorduroso é o armazenamento de lipídios. Os animais expostos ao lodo apresentaram o mesmo padrão de distribuição de lipídios encontrado no grupo controle, evidenciando que as substâncias

presentes no lodo não afetaram esta função das células. Em insetos, cerca de 70% do peso seco das células do corpo gorduroso é lipídio, sendo que a quantidade armazenada depende do estado nutricional e de desenvolvimento do organismo. Seu acúmulo aumenta durante o período de alimentação e diminui quando a alimentação cessa ou quando ele é utilizado na ovogênese ou durante o vôo (DOWNER, 1985; STEELE, 1985).

Segundo Heath (1995), durante as fases de respostas ao estresse em peixes, podem ocorrer três situações relacionadas ao acúmulo de glicogênio: a) na fase de alarme, mobilização do glicogênio hepático; b) na fase de resistência e adaptação, o glicogênio pode estar baixo ou não; e c) na fase de exaustão, pode ocorrer depleção do glicogênio hepático. Em um trabalho conduzido por Albinati et al. (2009) sobre o uso de brânquias, fígado e rins como biomarcadores histológicos em ensaios de toxicidade crônica com herbicida em peixes, foi observado um estado de estresse químico nos peixes expostos, uma vez que os vacúolos neles encontrados não indicaram a presença de glicogênio. Aqui, o mesmo pode ter acontecido, ou seja, os animais expostos ao lodo sofreram algum tipo de estresse, que provocou uma diminuição na quantidade de polissacarídeos neutros encontrados nas células dos animais expostos ao lodo de esgoto.

Em insetos, inseticidas podem interferir nas reservas de carboidratos e proteínas no corpo gorduroso (NATH et al, 1997; NATH, 2000). Modificações na morfologia do corpo gorduroso sugerem a disponibilidade e mobilização de reservas para manutenção do organismo possibilitando sua sobrevivência frente à moléculas tóxicas (RIBEIRO, 2005). No presente estudo, tanto as reservas de carboidratos quanto as reservas de proteínas podem ter sido utilizadas neste sentido, já que houve uma diminuição de suas quantidades com o aumento da concentração de lodo.

Por entre as células do corpo gorduroso foram encontradas pequenas células com formato circular ou elíptico, chamadas enócitos. Tais células apresentaram citoplasma repleto de grânulos corados por diferentes técnicas. São comumente descritas em insetos, onde possuem origem ectodérmica (LOCKE, 1969); possuem ultra-estrutura própria e ciclo de especialização e função conforme sua localização. Aspectos morfológicos sugerem que os enócitos possuem uma alta capacidade de absorver substâncias da hemolinfa através de invaginações de sua membrana. O desenvolvimento de seu retículo endoplasmático liso sugere que está, principalmente, envolvido no metabolismo de lipídios (FONTANETTI et al., 2004). Em *R. padbergi*, a análise ultra-estrutural indica que estão envolvidos na síntese e armazenamento de proteínas, em vez de lipídios (CAMARGO-MATHIAS; FONTANETTI, 2000). A associação entre os adipócitos e os enócitos sugere que este último também pode

estar envolvido na produção de elementos que participam do processo final da vitelogênese ou mesmo na produção do córion que envolve os ovos dos insetos (THIELE; CAMARGO-MATHIAS, 1999).

Os resultados acima descritos deixam claro que o lodo de esgoto deve ser adequadamente disposto, para que não haja contaminação dos solos e consequentes danos a sua fauna. De acordo com De Camargo et al. (2008), o problema deve ser tratado com seriedade e, com o auxílio de pesquisas científicas, alternativas seguras devem ser desenvolvidas para que este resíduo não se transforme em um novo problema ecológico. Por isso, a incorporação do lodo de esgoto ao solo para fins agrícolas deve ser cuidadosamente planejada e monitorada (BETTIOL; DE CAMARGO, 2006), sendo importante o conhecimento da concentração de possíveis componentes tóxicos, bem como dos efeitos da aplicação a longo prazo.

7. CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se que o corpo gorduroso perivisceral pode ser utilizado como biomarcador em análise toxicológica de solo, enquanto que o uso do corpo gorduroso parietal não é indicado para esta finalidade, já que não apresentou alterações. As alterações observadas no corpo gorduroso perivisceral foram:

- Degradação citoplasmática dos adipócitos
- Deformação e picnose dos núcleos dos adipócitos
- Aumento no número de esferocristais
- Alteração na quantidade de proteínas, polissacarídeos e cálcio nos adipócitos.

Conclui-se também que o lodo utilizado no estudo é tóxico para a espécie, indicando a necessidade de cuidado na utilização de lodo de esgoto na recuperação de solos e na agricultura.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBINATI A.C.L.; MOREIRA, E.L.T.; ALBINATI, R.C.B.; CARVALHO, J.V.; DE LIRA, A.D.; SANTOS, G.B.; VIDAL, L.V.O. Biomarcadores histológicos – toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 61, n. 3, 2009.
- ANDREOLI, C. V.; DE LARA A. I.; FERREIRA A. C.; BONNET B. R. P.; PEGORINI E. S.; Gestão dos Biossólidos Gerados em Estações de Tratamento de Esgoto Doméstico. **Engenharia e Construção**, n. 24, 1998.
- ANDREOLI, C.V.; PEGORINI, E.S.; HOPPEN, C.; TAMANINI, C.R.; NEVES, P. S. Produção, composição e constituição de lodo de estação de tratamento de água (ETA). In: ANDREOLI, C.V. **Alternativas de uso de resíduos do saneamento**. Rio de Janeiro: ABES, 2006, cap. 3, p. 29-48.
- 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.
- ARMANI, A.L.C. **Atlas de Patologia Geral**. Universidade Estadual de Londrina, 2007.
- ATSDR – AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for mercury (update)**. Draft. US Department of Health and Human Services, August, 2007, v. A16.
- BARBOSA, G. M. C.; FILHO, J.T.; BRITO, O.R.; FONSECA, I.C.B. Efeito residual do lodo de esgoto na produtividade do milho safrinha. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 3, Viçosa, 2005.
- BECKETT, P.H.T. Critical tissue concentrations as indicators of toxicity. **Suelos Ecuatoriales**. Bogota. 1991.
- BETTIOL, W.; DE CAMARGO, O. A. A Disposição de Lodo de Esgoto em Solo Agrícola. In: **Lodo de Esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 349p, 2006.
- BEYER, W. N.; PATTEE, O. H.; SILEO, L.; HOFFMAN, D. J.; MULHERN, B. M. Metal contamination in wildlife living near two zinc smelters. **Environ. Pollut. Ser.**, v. 38, p. 63-86, 1985.
- BOCCARDO, L.; JUCÁ-CHAGAS, R.; PENTEADO, C.H.S. Migration and population outbreaks of millipedes in the coffee plantations, region of Alto Paranaíba, MG, Brazil. **Holos Environment**, v.2, p.20-223, 2002.
- BOCCARDO, L.; PENTEADO, C.H.S.; JUCÁ-CHAGAS, R. Swarming of millipedes, a new case noticed in the district of Patrocínio – MG - Brazil. **J. Adv. Zool**, v.18, p.62-63, 1997.
- BOEIRA, R. C.; LIGO, M. A. V.; DYNIA, J. F. Mineralização de nitrogênio em solo tropical tratado com lodos de esgoto. **Pesq. agropec. bras.**, v. 37, n. 11, p. 1639-1647, 2002.

BRÉVAULT, T.; NAUDIN, K.; HERVÉ, G. Factors affecting cotton seedling in mulch-based cropping systems in North Cameroon. Disponível em <http://agroecologie.cirad.fr>. Acesso em 19 de agosto de 2009.

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.; MICÓ-BALAGUER, E. Histochemical studies of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 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 (Diplopoda, Spirobolida). **Biocell**. v. 24, n. 1, p. 1-12, 2000.

CETESB. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de estabelecimento de valores orientados para solos e água subterrâneas do Estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2001, 232p.

CLOUDSLAEY-THOMPSON, J.L. Significance of migration in myriapods. **Ann. Magaz. Natur. Hyst**, v. 2, p.947-62, 1949.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução 375/2006. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codleg=506> Acesso em: 06 junho de 2008.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunological Methods**. v. 265, p. 49-72, 2002.

DALLINGER, R.; BERGER, B.; BIRKEL, S. Terrestrial isopods: useful biological indicators of urban metal pollution. **Oecologia**, v.89, p.32-41, 1992.

DE CAMARGO, O. A.; PIRES, A. M. M.; BETTIOL, W. Lodo na agricultura. **Ciência Hoje**, v.42, n.248, p. 68-70, 2008.

DOWNER, R.G. H. Lipid metabolism. In: KERBUT, G. A.; GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 3. p.77-113

EBREGT, E; STRUIK, P.C.; ABIDIN, P.E.; ODONGO, B. Farmer's information on sweet potato production and millipede infestation in north-eastern Uganda. I. Associations between spatial and temporal crop diversity and the level of pest infestation. **NJAS**. v. 52, n. 1, 2004.

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, n. 2, p. 135-142, 2002.

FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. External morphology of the antennae of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Diplopoda: Spirobolida). **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 21, n. 2, p. 73-79, 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, n. 3-4, p. 487-493, 2006.

FONTANETTI, C.S.; CALLIGARIS, I.B.; SOUZA, T.S. Laudo sobre o surto de piolho-de-cobra no Parque das Universidades. Infestação de piolhos-de-cobra em Campinas. <http://www.baraoemfoco.com.br/barao/barao/pq-universidades/laudo.htm>, 2007. Acesso em 20 de agosto de 2009.

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

GOLOVATCH, S.I. On the identify of some millipede species described by C.O. Von Porat in 1988 (Diplopoda: Spirobolida). **Bull. Inst. R. Sci. Nat. Belg. Sci. Entomol.**, Bruxelles, v.7, p.95-106, 1997.

GOMES, S. B. V.; NASCIMENTO, C. W. A.; BIONDI, C. M. Produtividade e composição mineral de plantas de milho em solo adubado com lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 5, Campina Grande, 2005.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA. A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 53, n.3, p. 335-343, 2007.

HADDAD JUNIOR, V.; CARDOSO, J.L.C.; ROTTA, O.; ETEROVIC, A. Acidentes provocados por Millipede com manifestações dermatológicas: relatos de dois casos. **An. Bras. Dermatol.** v. 75, n. 4, p. 471-474, 2000.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. 2.ed. Florida: CRC Press, 1995, 384p.
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.

HOPKIN, S. P.; READ, H. J. **The biology of millipedes**. New York: Oxford University Press, 1992, 223p.

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. Le tissu adipeux de *Cylindroiulus teutonicus* Pocock (*londinensis* CLK, Diplopoda, Iuloidea); étude histologique et ultrastructural. **C. R. Acad. Sc. Paris**, v. 278D, p. 3343-3346, 1974.

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.

HUBERT, M. Sur la nature des accumulations minérales et puriques chez *Cylindroiulus teutonicus* Pocock (*londinensis* CLK, Diplopoda, Iuloidea). **C. R. Acad. Sc. Paris**, v. 281D, p. 151-154, 1975.

INYANG, U.E.; NDON, B.A. Millipede outbreaks in Akwa Ibom State, Southeastern Nigeria. **Global Journal of Pure and Applied Sciences**. v. 9, n. 4, p. 435-444, 2003.

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.

KAMMENGA, J. E.; DALLINGER, R.; DONKER, M. H.; KÖHLER, H. R.; SIMONSEN, V.; TRIEBSKORN, R.; WEEKS, J. M. Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 164, p. 93-147, 2000.

KITAMURA, P. C. Prefácio. In: **Lodo de Esgoto: Impacto Ambiental do Uso Agrícola**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 349p, 2006.

KOCSSIS, M. A.; DE MARIA, I. C. O efeito do lodo de esgoto na recuperação da estrutura física de solos degradados. <http://www.cibergeo.org/cigbnacional/VICBG>, 2004.

KÖHLER, H. R. Localization of metals in cells of saprophagous soil arthropods (Isopoda, Diplopoda, Collembola). **Microscopy Research and Technique**, v. 56, p. 393-401, 2002.

KÖHLER, H. R.; KÖRTJE, K. H.; ALBERTI, G. Content, absorption quantities and intracellular storage sites of heavy metals in Diplopoda (Arthropoda). **BioMetals**, v. 8, p. 37-46, 1995.

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

LOCKE, M. The ultrastructure of oenocytes in molt intermolt cycle on an insect. **Tissue and Cell**. v. 1, p. 103-154, 1969.

MALTA, T. S. Aplicação de lodos de Estações de Tratamento de Esgotos na agricultura: estudo do caso do município de Rio das Ostras – RJ. Tese de Mestrado em Engenharia

Sanitária e Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2001, 67p.

MARQUES, M.O.; BELLINGIERI, P.A.; MARQUES, T.A.; NOGUEIRA, T.A.R. Qualidade e produtividade da cana-de-açúcar cultivada em solo com doses crescentes de lodo de esgoto. **Biosci J.** v. 23, n.2, p. 111-122, 2007

MARQUES, M.O.; NOGUEIRA, T.A.R.; FONSECA, I.M.; MARQUES, T.A. Teores de Cr, Ni, Pb, e Zn em argissolo vermelho tratado com lodo de esgoto e cultivado com cana-de-açúcar. **Revista de Biologia e Ciências da Terra.** v. 7, n.1, p. 133-143, 2007.

MARTINS, A.L.C.; BATAGLIA, O.C.; CAMARGO, O.A.; CANTARELLA, H. Produção de grãos e absorção de Cu, Fe, Mn e Zn pelo milho em solo adubado com lodo de esgoto, com e sem calcário. **R. Bras. Ci. Solo.** v. 27, p. 563-574, 2003.

MELO, W. J.; MARQUES, M. O.; SANTIAGO, G.; CHELLI, R. A.; LEITE, S. A. S. Efeitos de doses crescentes de lodo de esgoto sobre frações da matéria orgânica e CTC de um latossolo cultivado com cana-de-açúcar. **R. Bras. Ci. Solo,** v. 18, p. 449-455, 1994.

MEYER, T.N.; DA SILVA, A.L.; Resposta celular ao estresse. **Rev. Ass. Med. Brasil.** v. 45, n. 2, p. 181-188, 1999.

MIYOSHI, A.R.; GABRIEL, V.A.; FANTAZZINI, E.R.; FONTANETTI, C.S. Microspines in the pylorus of *Pseudonannolene tricolor* and *Rhinocricus padbergi* (Arthropoda, Diplopoda). **Iheringia,** v.95, n.2, p.183-187, 2005.

NASCIMENTO, B.; SERMANN, H.; BÜTTNER, C. Biology and natural control of pest millipedes *Spinotarsus caboverdus* Pierrard (1987) from Cape Verde. In: Deutscher Tropentag – Challenges to Organic Farming and Sustainable Land Use in the Tropics and Subtropics, 2002, Witzenhausen, Alemanha.

NATH, B.S. Changes in carbohydrate metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* L. exposed to organophosphorus insecticides. **Pesticide Biochemistry Physiology.** v. 68, p. 1504-1515, 2000.

NATH, B.S.; SURESH, A.; VARMA, B.M.; KUMAR, R.P.S. Changes in protein metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepdoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity. **Toxicology and Environmental Safety.** v. 36, p. 169-173, 1997.

NIJIMA, K.; SHINOHARA, K. Outbreaks of the *Parafontaria laminata* group (Diplopoda, Xystodesmidae). **Japan Jour. Ecol,** v. 38, p.257-268, 1988.

PARAÍBA, L.C.; SAITO, M.L. Distribuição ambiental de poluentes orgânicos encontrados em lodo de esgoto. **Pesq. agropec. bras.** v. 40, n. 9, p. 853-860, 2005.

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

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

RADFORD, A.J.; Giant millipede Burns in Papua New Guinea. **Papua New Guinea Med. J.** v. 18, p. 138-141, 1975.

RIBEIRO, B.M. Custo adaptativo e assimetria flutuantes associados à resistência a inseticidas em populações de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Tese de Doutorado em Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, 2005.

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.

ROCHA, M.C.; SHIROTA, R. Disposição final de lodo de esgoto. **Revista de estudos ambientais**. v. 1, n. 3, 1999.

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.

SAWYER, C.N.; McCARTY, P.L. **Chemistry for environmental engineering**. 3^a ed. Singapura: McGraw Hill, 1978, 532p.

SCHUBART, O. O elemento "Synanthropo" e estrangeiro entre os Diplopoda do Brasil. **Arthropoda**, v.1, n.1, p.23-40, 1947.

SCHUBART, O. Os Myriápodes e suas relações com a agricultura. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 2, n. 16, p. 205-234, 1942.

STEELE, J.E. Control of metabolic processes. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. New York: Pergamon Press, 1985. v. 8, p. 99-145

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

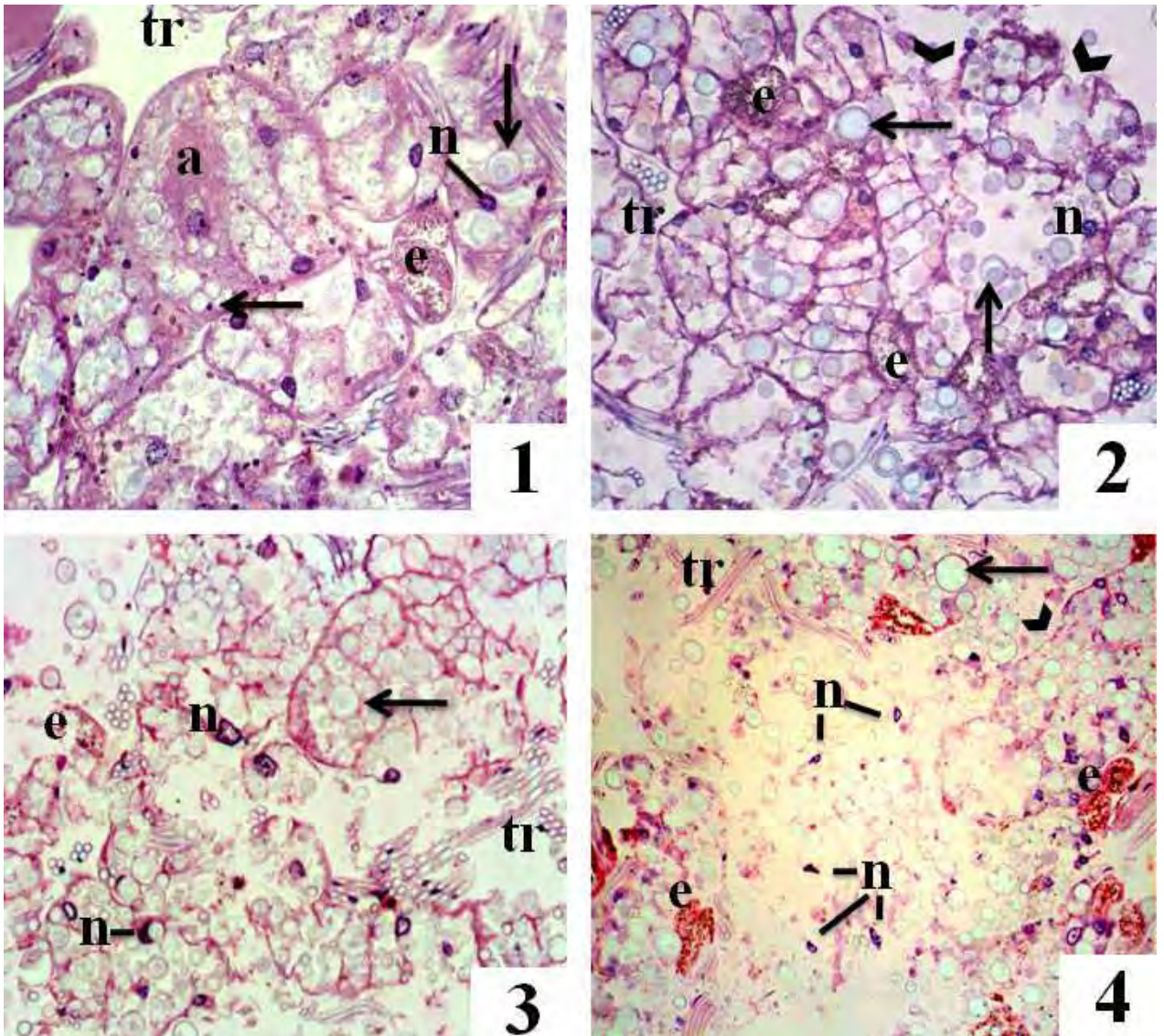
THIELE, E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Morphology, ultramorphology and histology of ovaries of workers and queens of *Pachycondyla striata* ants (Hymenoptera: Ponerinae) **Biocell**. v. 23, n. 1, p. 51-64, 1999.

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. **Fur angewandte Zool.**, v. 78, p. 277-287, 1991.

TSUTIYA, M. T. Uso Agrícola de Biossólidos de Estações de Tratamento de Esgotos Sanitários do Estado de São Paulo. 20^o Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, ABES, Rio de Janeiro, 1999.

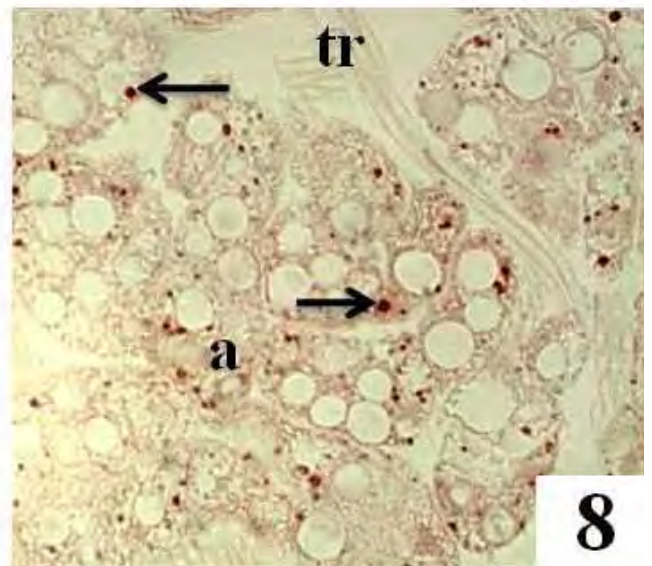
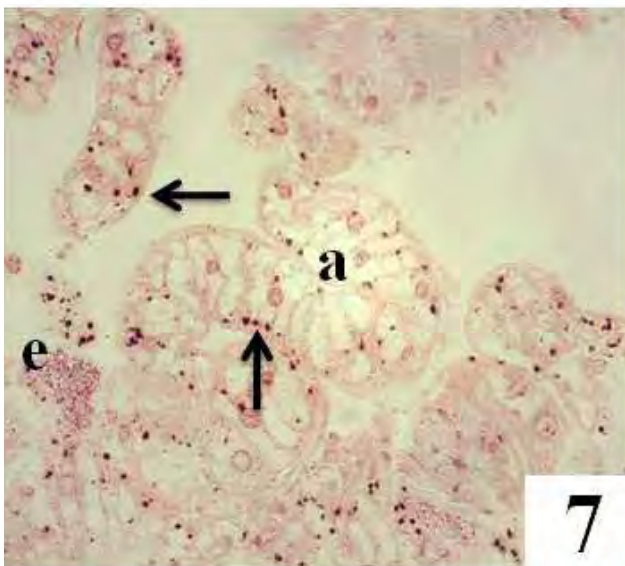
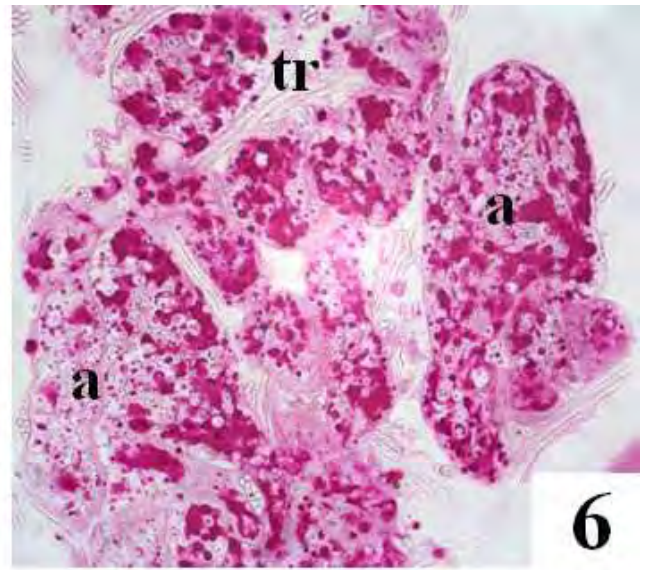
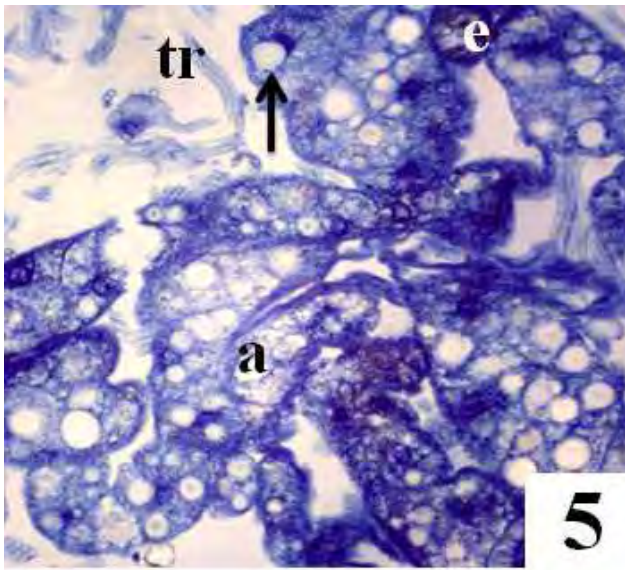
UMEH, V.C.; WALIYAR, F.; TRAORÉ, S.; CHAIBOU, I.M.; OMAR, B.; DETOGNON, J. Farmer's opinions and influence of cultural practices on soil pest damage to groundnut in west Africa. **Insect Sci. Applic.** v. 21, n. 3, p. 257-265, 2001.

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.



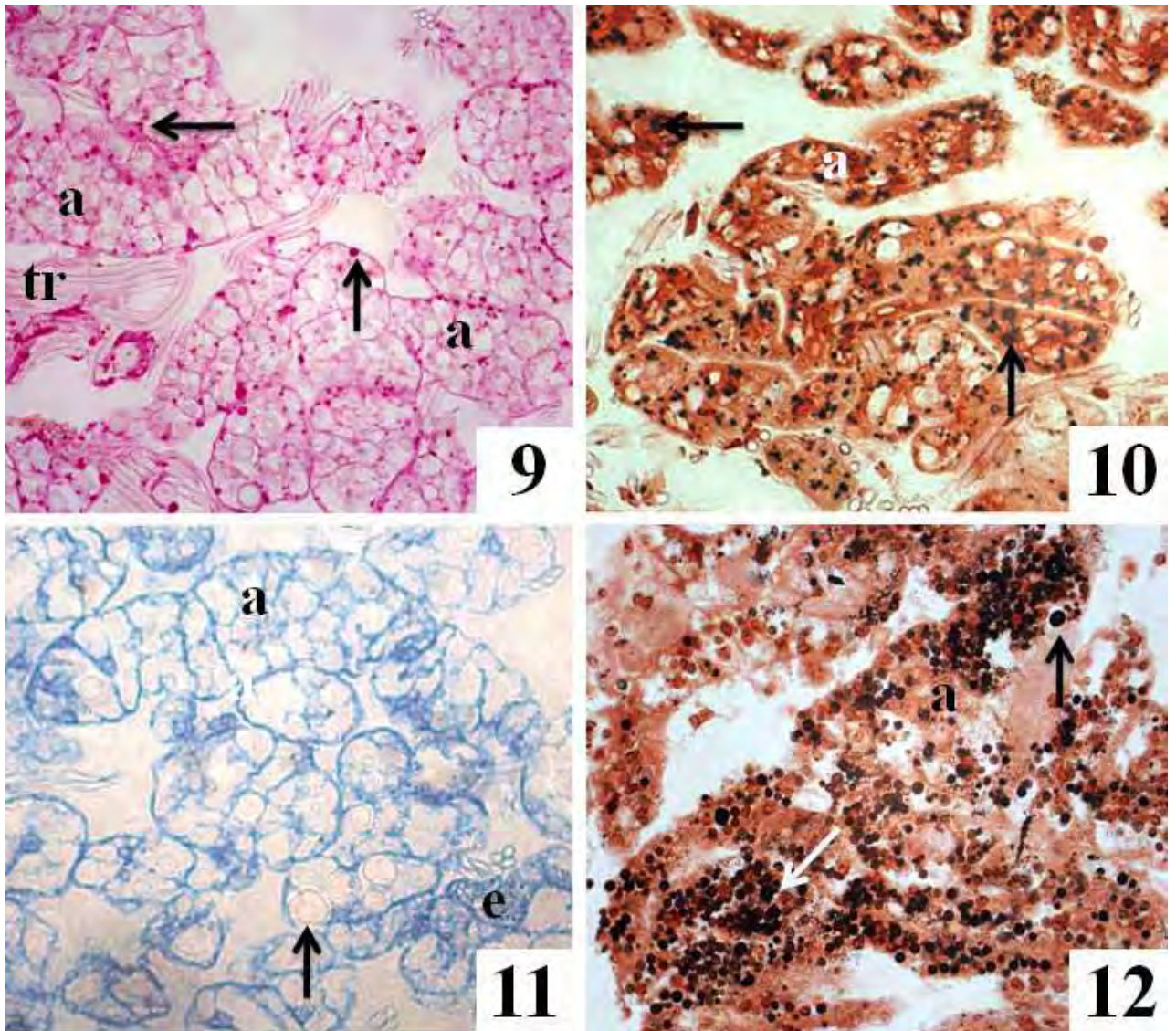
Figuras 1-4: Corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi* corado com Hematoxilina-Eosina. 1. sete dias de exposição, grupo controle; 2. sete dias de exposição, espécimen exposto a lodo com concentração em 50%; 3. quinze dias de exposição, espécimen exposto a lodo com concentração em 10%; 4. noventa dias de exposição, espécimen exposto a lodo com concentração em 50%. Aumento = 400x.

a = adipócito; cabeça de seta = perda da membrana; e = enócito; n = núcleo; seta = esferocristais; tr = traqueríola.



Figuras 5 - 8: Corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi* submetidos às técnicas de azul de bromofenol (figura 5), PAS (figura 6), von Kossa (figura 7) e sudan black (figura 8). Sete dias de exposição, grupo controle. Aumento = 400x.

a = adipócito; e = enócito; seta em 5 = esferocristais; seta em 7 = grânulos de cálcio; seta em 8 = grânulos de lipídios; tr = traqueríola.



Figuras 9 - 12: Corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi* submetidos às técnicas de PAS (figura 9), von Kossa (figuras 10 e 12) e azul de bromofenol (figura 11). 9. sete dias de exposição, espécimen exposto a lodo de esgoto com concentração em 50%; 10. quinze dias de exposição, espécimen exposto a lodo de esgoto com concentração em 1%; 11. quinze dias de exposição, espécimen exposto a lodo de esgoto com concentração em 10%; 12. noventa dias de exposição, espécimen exposto a lodo de esgoto com concentração em 1%. Aumento = 400x.

a = adipócito; e = enócito; seta em 9 = polissacarídeos; seta em 10 = grânulos de cálcio; seta em 11 e 12 = esferocristais; tr = traqueríola.

Raphael Bastão de Souza

(Aluno)

Carmem S. Fontanetti Christofolletti

(Orientadora)

Rio Claro, 16 de outubro de 2009

